



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİNDE
YATAN İKİ YAŞ VE ÜZERİ HASTALARDA *CLOSTRIDIUM
DIFFICILE* İLİŞKİLİ İSHALLERİN TOKSİJENİK KÜLTÜR, GDH
ENZİM, TOKSİN A/B VE PZR İLE TOKSİN GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem KOYUNCU ÖZYURT

Antalya, 2016



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİNDE
YATAN İKİ YAŞ VE ÜZERİ HASTALARDA *CLOSTRIDIUM*
DIFFICILE İLİŞKİLİ İSHALLERİN TOKSİJENİK KÜLTÜR, GDH
ENZİM, TOKSİN A/B VE PZR İLE TOKSİN GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem KOYUNCU ÖZYURT

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Betil ÖZHAK BAYSAN

“Kaynak gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.04.0103.009 numaralı proje no ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Çalıőmamda bana her türlü yardım ve desteği sağlayan ve eğitimim süresince bilgi ve becerimin artmasında değerli katkıları bulunan, baőta Anabilim Dalı Baőkanı hocalarım Sayın Prof. Dr. Dilek ÇOLAK ve Sayın Prof. Dr. S. Tümer VURAL olmak üzere, Sayın hocam Prof. Dr. M. Dilare ÖĞÜNÇ ve tez danıőmanım Doç. Dr. Betil ÖZHAK BAYSAN'a teőekkürü borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN'e, Sayın Prof. Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Sayın Doç. Dr. Derya MUTLU'ya, Sayın Prof. Dr. Mete EYİGÖR'e ve Sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmamda istatistiki bilgilerin oluőturulmasında katkıları olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Levent DÖNMEZ'e ayrıca teőekkür ederim.

Tüm uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıőtığım tüm asistan arkadaşlarıma ve Merkez Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma yardım ve desteklerinden ötürü teőekkür ederim.

Bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan annem, babam ve kardeőlerime, eğitimim süresince desteğini esirgemeyen sevgili eőime ve varlığıyla hayatımı renklendiren kızım Elif'e sevgilerimi sunarım.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Araştırma Etik Kurul Onayı	31
3.2. Hasta Seçimi	31
3.3. İstatistiksel Yöntem	31
3.4. Kültür	31
3.5. GDH Antijen Spesifik Enzim İmmun Assay (GDH-EIA) ile GDH Antijeni ve Toksin A/B Saptanması	33
3.6. PZR	34
3.7. L-Prolin Aminopeptidaz Enzimini Saptayan PRO Kit (REMEL)	35
3.8. <i>C.perfringens</i> Enterotoksin Testi	36
3.9. Cihazlar ve laboratuvar Malzemeleri	37
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
7. ÖZET	53
8. ABSTRACT	54
9. KAYNAKLAR	55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
ϵ	Epsilon
i	İota
AAD	Antibiyotikle İlişkili İshal (Diyare)
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ASM	American Society for Clinical Microbiology
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CCFA	Sikloserin-Sefoksitinli Fruktoz Agar
CDE	<i>C. Difficile</i> Enfeksiyonu
CDSA	<i>Clostridium Difficile</i> Selektif Agar
CDT	Binary Toksin = <i>C.difficile</i> Transferaz
CdtLoc	CDT Lokusu
CMV	Sitomegalovirüs
CPE	Enterotoksin
CWP	Hücre Duvarı Proteinleri
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EIA	Enzim İmmunoassay
ESGCD	Avrupa <i>Clostridium Difficile</i> Çalışma Grubu
Fbp	Fibronektin Bağlayıcı Protein
FDA	Food and Drug Administration
fliC	Flagellin Monomeri
fliD	Flagellar Cap Proteini

GDH	Glutamat Dehidrogenazi
GDH-EIA	GDH Antijen Spesifik Enzim İmmun Assay
GLK	Gaz Likit Kromatografisi
GTPaz	Küçük Guanin Trifosfataz
H-2B	Histamin Reseptör-2 Blokör
IL	İnterlökin
LSR	Lipoprotein Reseptör
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption İonization-Time of Flight Mass Spectrometry
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
OD	Optik Dansite
PaLoc	Patojenik Lokus
pg	Pikogram
PMC	Pseudomembranöz Enterokolit
PMG	Pepton-Maya Özütü-Glikoz
PPI	Proton Pompa İnhibitör
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SLP	S Tabakası
<i>tcdA</i>	Toksin A geni
<i>tcdB</i>	Toksin B geni
UV	Ultraviyole

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
4.1.	Toksijenik kültürü pozitif bulunan hastaların demografik özellikleri	40
4.2.	Kültürde üretilen <i>Clostridium</i> türlerinin test sonuçları	42
5.1.	Çalışmamızda elde edilen EIA-GDH testinin geçerlilik sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılması	45
5.2.	Çalışmamızda elde edilen EIA toksin A/B testinin geçerlilik sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılması	47
5.3.	PZR (BDMAX) testinin geçerlilik sonuçları	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>C. difficile</i> toksin genleri, PaLoc bölgesi	7
2.2. <i>C.difficile</i> toksin üretimi düzenlenmesi	8
2.3. CodY geni tarafından toksin üretiminin düzenlenmesi	8
2.4. <i>C. difficile</i> toksin A ve B'nin intestinal epitel üzerine etkisi	9
2.5. ASM'nin tanı için önerdiği algoritmalar	25

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Clostridium difficile</i> koliti, minör değişiklikler	14
2.2. PMC, sarı renkli plaklar (psödomembranlar)	15
2.3. <i>C.difficile</i> 'nin CCFA besiyerindeki görüntüsü	22
3.1. EIA testinin sonuçlarına örnek	34
3.2. Prodisk testi pozitif	36

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Clostridium türleri doğada çok yaygın olup, sularda, insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunabilirler. *Clostridium difficile*, antibiyotik kullanımına bağlı, kendiliğinden iyileşen akut ishalden fulminan pseudomembranöz enterokolite (PMC) kadar değişen, geniş bir yelpazede hastalıklara yol açan, gram pozitif, sporlu, anaerob bakterilerdir (1-3).

Antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında gelişen ve başka nedenle açıklanamayan ishaller genel tanımla “antibiyotikle ilişkili ishal (diyare) [AAD]” olarak adlandırılırlar. Antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-25’inde etken *C. difficile*’dir (1). Hastalığa, toksin salgılayan *C. difficile* kökenleri neden olmaktadır. Bu kökenlerin, patogeneizde önemli role sahip, moleküler ve biyolojik aktiviteleri iyi tanımlanmış ve birbirlerinden farklı iki toksin; toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) salgıladıkları bulunmuştur. Son yıllarda toksin A ve toksin B üretiminde farklılıklar veya toksin genlerinde varyasyon geliştirmiş kökenler (toksin A-/B+ gibi) saptanmıştır. Ayrıca, bazı ülkelerde hastane salgınlarına neden olan, toksin A ve B’den farklı, “binary toksin” üreten kökenler bildirilmiştir. Özellikle son yıllarda ölümcül olabilen ciddi hastalığa yol açan grup BI, ribotip 027 kökeninde artış görülmektedir (4). Pseudomembranöz kolitlerin ise %99’undan *C. difficile* sorumludur (5). Önceleri klindamisin kullanımı ile ilişkilendirilen *C. difficile* kolitinin, kolon florasına etkili ampicilin, amoksisilin ve sefalosporinler gibi diğer antibiyotiklerin kullanımından sonra da ortaya çıktığı saptanmıştır (1). *C. difficile*’ye bağlı enfeksiyonların oluşmasında antibiyotik kullanımından başka, hastanede kalış süresi, altta yatan hastalığın şiddeti, yaşlılık, yoğun bakımda yatma, bağırsakların ameliyat öncesi mekanik temizliği, radyasyon gibi değişik risk faktörleri rol oynamaktadır (6). *C. difficile*, sağlıklı kişilerin yaklaşık %3-5’inin bağırsak florasında saptanırken, hastanede yatanlarda ise %20 oranındadır. Yenidoğanların gastrointestinal sisteminde %60-70 oranında kolonize olabilmektedir (7). *C. difficile*, kanlı agar besiyerinde, 48 saat anaerobik ortamda inkübe edildikten sonra, at dışkısı kokusunda, hemolizsiz, sarımsı-yeşil floresans veren yaklaşık 2-4 mm çapında, koloniler oluşturmaktadır. *C. difficile*’nin dışkıdan izole edilmesi oldukça zordur. Bunun için özel ayırıcı ve seçici bir besiyeri olarak sikloserin-sefoksitinli fruktoz agar

(CCFA) kullanılır. *C. difficile*, indikatörlü (nötral kırmızısı) CCFA besiyerinde UV (Ultraviyole) lambası altında incelendiğinde floresans veren, yaklaşık 2-4 mm çapında, altın sarısı renginde koloniler oluşturur (7, 8). Dışkı kültürünün duyarlılığı en yüksek olup, özellikle epidemiyolojik çalışmalar için kullanılır (9). Ancak kültürde üretmenin zor olması, toksijenik ve nontoksijenik suşların ayırt edilememesi ve ancak 3-5 gün sonra üretilmesi gibi nedenlerle rutin tanıda ağırlıklı yeri yoktur. Salgın durumlarında ve epidemiyolojik açıdan kültürde üretme çok önemlidir. Kültürde üretmenin yanında, toksin testleri de birlikte yapılmalıdır (8, 10). Daha önceden dışkı örneklerinde 10 pikogram (pg)'lık sitotoksin saptayabilen doku kültürleri, toksin varlığını araştırmada altın standart olarak kabul edilirken, artık toksijenik kültür tanıda altın standart kabul edilmektedir. Enzim immunoassay (EIA) testleri de kısa sürede sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin daha kolay, ucuz olması nedeniyle rutin klinik laboratuvarlarda önerilmektedir. Ancak sitotoksik testlerden daha az duyarlıdır. Günümüzde ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), sitotoksik testlere alternatif yöntem olarak gösterilmektedir. *C. difficile* kökenlerinin PZR ile spesifik toksin A, toksin B ve "binary toksin" primerleri ile toksin gen durumu saptanabilmekte ve bu kökenler içerisinde varyant kökenler var ise bunlar tesbit edilebilmektedir (10).

Ülkemizde ve hastanemizde nozokomiyal ishal ve bu ishallerde *C. difficile* sıklığı net olarak bilinmemektedir. Özellikle son yıllarda tedavi başarısızlıkları ve mortalite artışının gözleniyor olması, hastane salgınlarının kontrolünde yaşanan güçlükler, etkenin antibiyotik direncindeki artışları konunun bir kat daha önem kazanmasına neden olmuştur. Ayrıca toplumda yayılımı, hastanelerde son derece yoğun toksin yapan kökenlerin hızla yayılımı ve proton pompa inhibitörleri kullanımı gibi yeni risklerin belirlenmesi yeniden bu etkene yönelimi arttırmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen bu etkenle ilgili epidemiyolojik bilgiler ve tedavi yaklaşımları konusunda görüşler belirsizliğini korumaktadır (9, 11).

Bu çalışmada, *C. difficile* nedenli ishal olduğu düşünülen hastaların dışkı örneklerinden EIA yöntemi ile toksin varlığının aranması, aynı örneklerin kültürlerinden ise *C. difficile* kökenlerinin izolasyonunun yapılması ve PZR ile toksin araştırılması yapılarak hastanemizde, *C. difficile* nedenli ishal sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bakteriler; büyümeleri ve diğer aktiviteleri için gerekli olan enerjileri baz alınarak aerob, anaerob ve fakültatif anaerob bakteriler olarak ayrılırlar. Aeroblar, son elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanırlar ve oksijen yokluğunda üreyemezler. Fakültatif mikroorganizmalar hem oksijen varlığında hem de yokluğunda üreyebilirler. Anaerob bakteriler ise oksijen varlığında üreyemezler. Oksijen bu bakteriler için toksiktir.

İnsan florasının çoğunu anaerobik bakteriler oluşturur. Kolonda yaygın olarak anaerob bakteriler bulunur. Çoğu anaerobik enfeksiyon endojen olarak mikroflora üyelerinden gelişir. Bu enfeksiyonlardan birisi de *Clostridium* türü bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardır (12).

Clostridium cinsi bakteriler, *Firmicutes* şubesinin, *Clostridia* sınıfının, *Clostridiales* takımının, *Clostrideaceae* familyasına bağlıdır. *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi* gibi türleri bulunmaktadır. *Clostridium* türleri, gram pozitif, çoğu hareketli, zorunlu anaerob, katalaz negatif, fermentatif, endospor üreten basil şeklindeki bakterilerdir. Endosporlar ısıya karşı çok dayanıklı olduklarından konserve besinlerin üretim teknolojisinde önem taşırlar. Bu özellikleri dolayısıyla bazı besinlerin sterilizasyonu için gerekli ısı-zaman düzenlerinin belirlenmesinde indikatör mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. *Clostridium* türleri doğada çok yaygın olup, sulara, insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunabilirler. İnsanlarda hastalık yapan türlere örnek olarak *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile* verilebilir. *C. perfringens* özellikle et ürünlerinde üreyerek besin zehirlenmelerine neden olmakta, ayrıca kirli yaralarda gazlı gangrene ve az oranlarda AAD'ye de neden olduğu bilinmektedir. *C. botulinum* ise düşük asitli konserve besinlerde üreyerek besin zehirlenmelerine neden olmaktadır. *C. tetani* ekzotoksini tarafından oluşturulan, akut başlayan, ağrılı kas kontraksiyonları, yaygın kas spazmları ile karakterize tetanoz hastalığına neden olmaktadır. *C. difficile* ise, antibiyotik kullanımına bağlı, kendiliğinden iyileşen akut ishalden fulminan PMC'ye kadar değişen, geniş bir yelpazede hastalıklara yol açabilmektedir (1-3).

2.1. *Clostridium difficile*

Clostridium difficile oval-subterminal sporlu, hareketli, boyutları 0,5-1,9 x 3,0-16,9 µm arasında değişebilen anaerob bir bakterilerdir. Genç kültürlerde Gram-pozitif iken, 24-48 saat sonrasında Gram-negatif boyanabilirler. Bu bakteriler jelatini eritir, süt ve et proteinlerine etkinlikleri yoktur. Fruktoz, glikoz, mannitol, mannoz ve sıklıkla ksilozu fermente ederler. Lesitinaz ve lipaz üretmez, at kanında hemoliz oluşturmazlar. Pepton-maya özütü-glikoz (PMG) besiyerinde asetik, izobutirik, butirik, valerik, izovalerik, izokaproik, formik, laktik asitler üretirler ve tirozini parakresole çevirebilirler. Bu özellikleri ile sikloserin-mannitol agar, sikloserin-mannitol kanlı agar, sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar besiyerleri seçici ayırıcı besiyerleri olarak kullanılmaktadır. *C. difficile*, kanlı agar besiyerinde, 48 saatlik anaerob inkübasyonu takiben, hemolizsiz, at dışkısı kokusunda koloniler oluşturmaktadır (7, 8).

2.1.1. Tarihçe

Clostridium difficile, ilk kez 1935 yılında sağlıklı yenidoğanların bağırsak florasında saptanmıştır. Saf kültürünü elde etmekte oldukça zorlanılan bu bakteriye güç (difficult) anlamına atfen *C. difficile* adı verilmiştir (13).

On dokuzuncu yüzyıl sonlarında tanımlanan PMC olgularının sıklığının artması, araştırmacıları, bu hastalık üzerinde daha fazla araştırma yapmaya itmiştir. İlk olarak PMC'den *Staphylococcus aureus* sorumlu tutulmuştur. Oral vankomisin ile tedavisinde başarı sağlanmış ve bu hastalık için bir tedavi seçeneği olarak görülmüştür. *C. difficile*'nin hastalığıdaki rolü, 1970'lerin başına kadar belirlenememiştir. Tedesco ve arkadaşları çalışmalarında, klindamisin'in ciddi diyareye neden olduğunu göstermişlerdir. Bu prospektif çalışmada klindamisin tedavisi alan hastalarda diyare sıklığının arttığı belirlenmiş ve daha önce etken olduğu düşünülen *S. aureus* suşlarına rastlanılmamıştır (14, 15). Bin dokuz yüz yetmiş sekiz yılında klindamisin tedavisi alan hastaların dışkılarından primer ajan olarak *C. difficile* izole edildiği bildirildikten sonra PMC'in primer etkeni olarak tanımlanmış ve bunu, PMC ile antibiyotik tedavisi, *C. difficile* kolonizasyonu ve sitotoksin üretimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu gösteren diğer çalışmalar izlemiştir (16, 17). Laughon ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptığı çalışmada PMC'li hastaların dışkı örneklerinde sitotoksik bir madde varlığı gösterilmiştir (18). Bu tarihten sonra *C.*

Difficile enfeksiyonu (CDE) insidansı giderek artmış ve bugün dünya genelinde nozokomiyal diyarenin en sık görülen etkeni haline gelmiştir (16).

2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler

C. difficile, *Firmicutes* şubesinde yer alan gram pozitif basil şeklinde, sporlu, zorunlu anaerob bir bakteridir. Toksin oluşturan (toksikjenik) ve toksin oluşturmayan suşları vardır. Her iki tip suş da insan ve insan dışı memeli konaklarda kolonize olabilmektedir. Ancak sadece toksikjenik olan suşlar enfeksiyon oluşturabilirler (19). Vejetatif hücrelerin baskın olduğu logaritmik üreme döneminde bakteri oksijene oldukça duyarlıdır. Sporlar (subterminal ve bazen de terminal) bulaşıcı şekilleridir; bakterinin konakta canlı kalmasında rolleri vardır ve tedavi kesildikten sonraki dönemde hastalığın rekürrensinden sorumludurlar (15, 20).

2.1.3. Patogenez

Normal kolon florası bozulduğunda ve organizma için uygun kolonizasyon olduğunda toksin üreten *C. difficile* sporlarıyla temas eden kişide hastalık gelişebilmektedir. Yapılan çalışmalarla, kompleks bağırsak ekosistemi içinde mikrobiyolojik ve hücrel etkileşimler aydınlatılmıştır (21). Bir diğer önemli faktör ise konak immun sistemidir. Yaşlılarda ve humoral immun cevabı azalmış kişilerde hastalık daha ağır seyretmektedir. Antitoksin antikorlar hastalıktan koruyabilmekte ve ayrıca immun düşkünlerde görülen hastalıktaki değişiklikleri açıklayabilmektedir (22, 23).

Antibiyotikler, endojen bağırsak florasının kaybına neden olduklarından, *C. difficile* hastalığı gelişimi için major risk faktörüdür. Endojen flora kaybolduğunda ise *C. difficile* çoğalır ve bağırsak mukozasını tahrip eder. Bağırsak florası ile ilgili yapılmış çoğu çalışma, antibiyotik tedavisinin yol açtığı önemli değişiklikleri açığa çıkarmıştır. Bu çalışmalar, CDE geçirenlerde, bağırsak florasının tekrar oluşmasındaki yetersizlikten dolayı rekürrensler görülebileceğini göstermiştir (24). Daha sonraki çalışmalarda da, rekürrens CDE'si olan hastaların tedavisinde fekal transplantasyonun ne kadar önemli olduğu gösterilmiştir (25, 26).

CDE'nin oluşumunda, normal bağırsak florasının koruyuculuğu tam olarak açıklanamamış ancak bazı hipotezler öne sürülmüştür;

Hipotezler;

1. Safra asidinin *C. difficile* sporlarına etkili olması,
2. *C. difficile* üremesini inhibe eden normal flora üyeleri tarafından üretilen antimikrobiallar, bakteriyosinlerin üretimi sayesinde oluşan direkt antagonizma,
3. İntestinal flora tarafından üretilen TLR-5 ile doğal immun yanıtın uyarılması,
4. Sınırlı beslenme kaynakları için *C. difficile* ve flora arasında yarış olması (21).

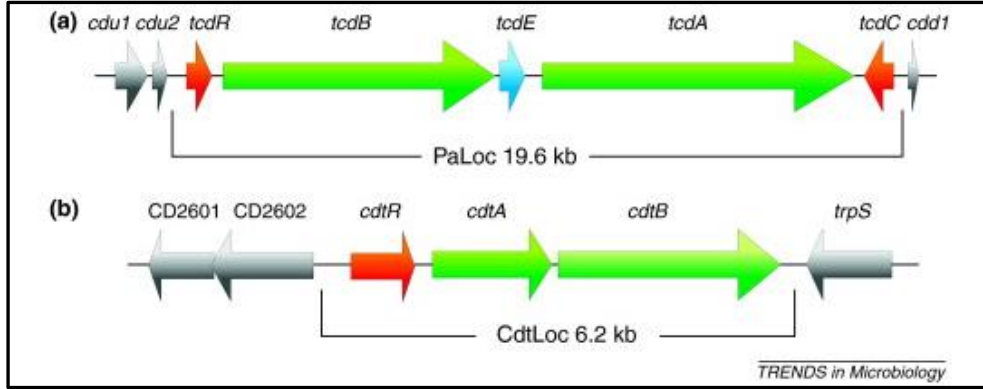
C. difficile genomunun önemli bir bölümü, gastrointestinal bölgede yaşamını sürdürmesini sağlayan genleri taşımaktadır. Bu gen bölgeleri, karbonhidrat transport ve metabolizmasına yardım eden p-hidroksifenilasetat dekarboksilaz gibi enzimleri kodlamaktadır. Bu enzim, P-krezol gibi bağırsak florasını inhibe edebilen bakteriyostatik bileşenlerin üretilmesini sağlar (27, 28). Bu bileşik ayrıca kültürde üretildiğinde at pisliği kokusunu veren bileşiktir. Ek olarak, *C. difficile*, konak besinlerinde bulunan nitrojen ve fosfolipidleri kullanabilmesi ve safra asidi varlığında da yaşamını sürdürebilmesi için başka bileşenlerde üretirler (28).

C. difficile'nin temel virülans faktörleri geniş clostridial sitotoksin ailesinin iki üyesi olan toksin A (*tcdA*) (enterotoksin) ve toksin B (*tcdB*) (sitotoksin)'dir. Her iki toksin de potansiyel sitotoksik aktivite gösterir ve hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive ederler. Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekretuar ishal oluşmasına neden olmaktadır. Ancak toksin B, toksin A'dan 1000 kat daha güçlü sitotoksositeye sahiptir (29).

Önceki çalışmalarda toksin A'nın CDE oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmekteyken, yapılan deneysel hayvan çalışmalarında toksin A negatif ve toksin B pozitif *C. difficile* izolatlarının da ciddi bir hastalık tablosu oluşturdukları görülmüştür. Bu çalışmalar, toksin B'nin toksin A gibi enterotoksin etkisi gösterdiğini ve hastalık oluşumunda esas faktör olduğunu düşündürmüştür. Bu toksinler patojenik lokus (PaLoc) olarak isimlendirilen genom bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır. Bu bölge, kromozomun 19.6 kb'lik bir bölgesidir (Şekil 2.1). Bu lokus bugüne kadar analiz edilen tüm toksijenik *C. difficile* kökenlerinde aynı kromozomal bölgede yer almaktadır. Toksijenik olmayan kökenlerde (TcdA-TcdB-) PaLoc yoktur. PaLoc'un yerine 115 baz çiftlik kodlayıcı olmayan bir bölge bulunur.

Bir kısım kökenlerde PaLoc bölgesi defektif olabilir ve bu tip defektif kökenler de hastalık oluşturabilirler. PaLoc bölgesinin DNA dizisi değişkendir ve bu bölgede değişiklik gösteren kökenler farklı toksinotipler olarak tanımlanmaktadır (15,30).

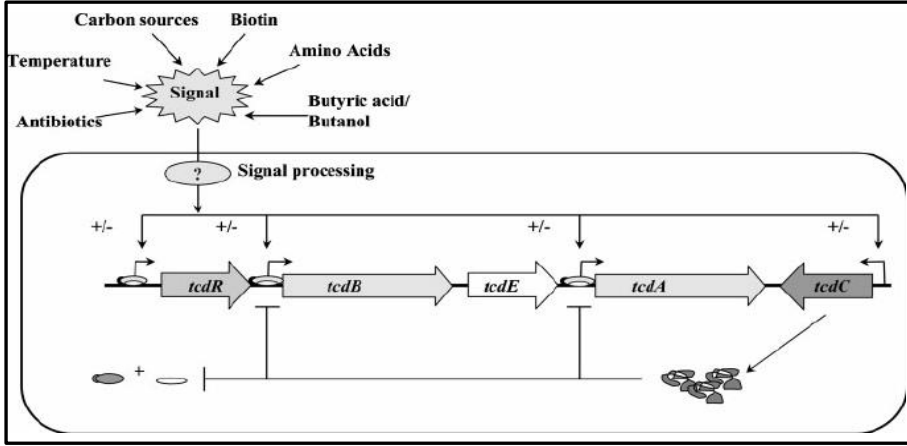
PaLoc üzerinde toksin A ve B'nin sentez ve düzenlenmesini sağlayan *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olmak üzere beş gen bölgesi içermektedir (30).



Şekil 2.1. *C. difficile* toksin genleri, PaLoc bölgesi (31).

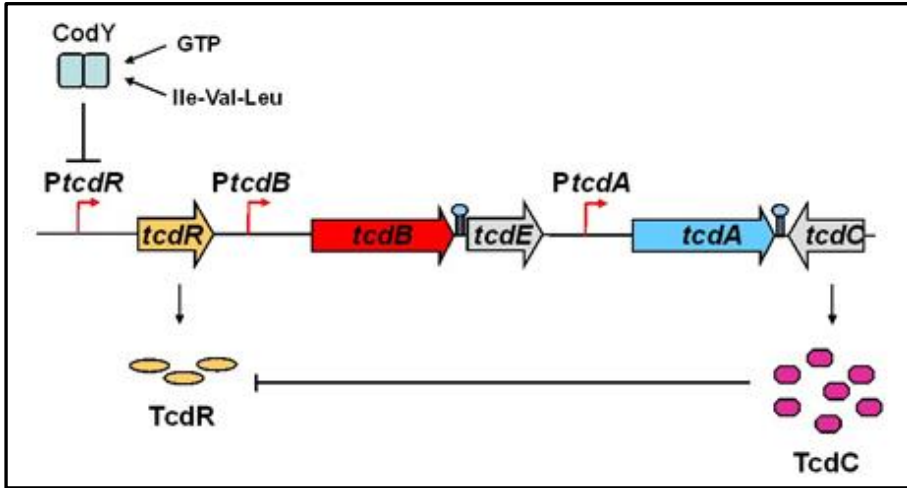
Bunlardan *tcdA* ve *tcdB* genleri birbirine çok yakındır ve *tcdE* gen bölgesi ile birbirlerinden ayrılırlar. *TcdE* geni por oluşturucu özelliktedir. Bakteriyofaj proteinleri ile homoloji gösteren bir proteini (*tcdE*) kodlar. Bu nedenle *tcdE*'nin hücreden *tcdA* ve *tcdB*'nin salınımında rol oynayabileceği düşünülmektedir (15,30). *TcdB*'nin önünde yer alan *tcdR* (önceden *tcdD* olarak bilinen), RNA polimeraza bağlanarak *tcdR*, *tcdB*, *tcdE*, ve *tcdA* genlerinin translokasyonunu stimüle eden alternatif bir sigma faktörü olarak görev yapan (pozitif transkripsiyonel regülasyon) *tcdR* proteinini kodlar (32, 33). Toksin genlerinin başlıca pozitif regülatörü olan bu protein ortam koşullarına duyarlıdır (15).

PaLoc'taki genlerin en ucunda bulunan *tcdC* geni ise *tcdR*'nin aksine bir negatif regülatör olarak toksin oluşumunu kontrol eder (34). Bu *tcdC* proteini PaLoc'un transkripsiyonu önlemek için *tcdR* ile RNA polimerazın ilişkisini bloke eden bir antisigma faktörü olarak rol oynar (15, 33). *TcdC* eksponansiyel üreme fazında, diğer bütün genler ise sitasyon fazda eksprese olur (15). *TcdA* ve *tcdB*'nin üretimi kökene ve besin miktarı (glikoziaminoasit, biyotin gibi), sıcaklık gibi çevresel faktörlerle subinhibitör konsantrasyonda antibiyotik varlığına bağlıdır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *C. difficile* toksin üretimi düzenlenmesi (35).

Bir diğer toksin düzenleyici gen PaLoc dışında bulunan CodY genidir. Bu gen, çevresel besin maddelerine (karbonhidrat, aminoasit gibi) göre hareket eder. Belirli aminoasitler ve GTP gibi yeterli besin varlığında CodY'nin *tcdR*'nin promotör bölgesine bağlandığı ve toksin gen ekspresyonu baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 2.3). Besin eksikliği söz konusu olduğunda, toksin geni ekspresyonu üzerindeki baskı kalkar. Bir toksin geni regülatörü olarak CodY'nin tanımlanması, *C. difficile* tedavisinde faydalı olabilecek bileşiklerin geliştirilmesi açısından potansiyel bir hedef olarak da düşünülmektedir (15).



Şekil 2.3. CodY geni tarafından toksin üretiminin düzenlenmesi (36).

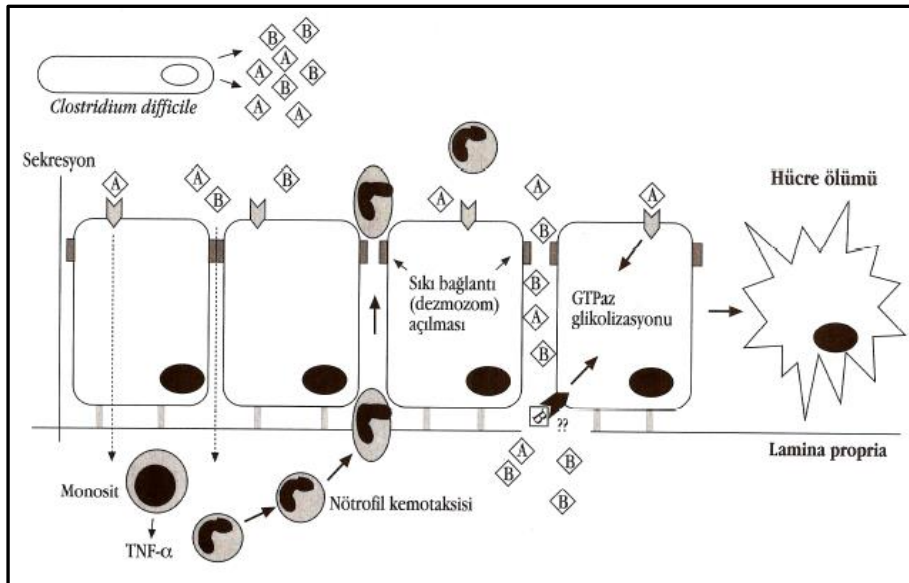
Toksin A (*tcdA*), 308 kDa'luk bir enterotoksindir, toksin B ise (*tcdB*) 270 kDa'luk bir sitotoksindir. Toksin A ve B genel olarak birbirleriyle %66 aminoasit homolojisi gösterirler. Her iki toksinde homoloji gösteren başlıca bölgeler, toksinlerin

enzimatik ve reseptör bağlayan bölgeleridir. *tcdA* ve *tcdB*'nin N terminal bölgesinde %74 homoloji görülür. Bu homoloji her iki toksinin benzer substrat özgülüğü için bir temel oluşturmaktadır (17).

Toksinlerin aktivitesi amino-terminal (N-terminal) bölgede bulunur ve ilk 543 aminoasit, glikoziltransferaz aktivitesinin tamamen ortaya çıkması için yeterlidir. Sitozolün içinde bulunan bu kısma girmeden önce bu aminoasit segmentinin ayrılması korunmuş bir bölgede (sistein proteaz bölgesi) meydana gelir (15).

Toksin A ve B'nin hedef hücrede bağlandığı reseptörler henüz belirlenememiştir (37). İnsanda kolonda bulunan gp96 glikoprotein toksin A için bir koreseptör olduğu bildirilmektedir (15). Toksinler konak hücre zarında farklı bölgelere tropizm gösterirler. *tcdA* konak hücrenin apikal bölgesine daha etkili bir şekilde bağlanırken, *tcdB* konak hücrenin bazolateral bölgesindeki bilinmeyen bir reseptöre bağlanmaktadır (32).

Toksinler reseptörle ilişkili endositoz yoluyla konak hücelere girerler. Endozoma giren toksinler orada aktifleşerek translokasyonu sağlar, toksinlerden ayrılan katalitik bölge sitoplazmaya girer (16, 32). Hücre içine girdiğinde toksinlerin hedefi Rho ve Ras ailesinden Rho, Rac, ve cdc gibi küçük guanin trifosfatazlardır (GTPaz'lar). Toksin aktive olduktan sonra konak GTPaz'larını glikozilleyerek inaktive eder (33, 38). Glikolizasyon, Rho GTPaz'ların aktif yapısı için gerekli olan yapısal değişiklikleri engellemiş olur (15) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *C. difficile* toksin A ve B'nin intestinal epitel üzerine etkisi (39).

C. difficile'nin, ikili toksin [binary toksin = *C. difficile* Transferaz (CDT)] adı verilen üçüncü bir toksini daha vardır. Binary toksin, hücre iskeletine zarar vererek hücrenin yuvarlaklaşması ve sonuçta hücre ölümüne yol açan aktine özgül bir ADP-ribozil transferazdır. Binary toksinin alt üniteleri (CdtA ve CdtB) tek başlarına toksik özellikte olmayıp, *in vitro* koşullarda birlikte etki göstererek vero hücrelerinde sitotoksositeye neden olmaktadır. Bu toksin, 6.2 kb'lik CDT lokusunda (CdtLoc) kodlanır. CDT lokusu suşların yaklaşık %6-12.5'unda bulunur (15,32). CDT'nin patogenezdaki rolü tam olarak anlaşılammıştır. CDT insidansının kimi epidemik kökenlerde (027 ve 078 ribotipleri gibi) daha yüksek olması ve CDT oluşturan *C. difficile* kökenlerinin bu toksini oluşturmayan kökenlere göre daha yüksek mortaliteye neden olması CDT'nin hastalığın şiddetine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (16, 19). Yeni bulgular, CDT'nin epitel hücrelerinin yüzeyi üzerinde yeni, ince dinamik mikrotübüllerin oluşumuna neden olduğunu ve bu yapıların *Clostridium*'ların aderansının 4-5 kat artmasına yol açarak bağırsak kolonizasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (40). CDT reseptörü olarak bir lipoprotein reseptör (LSR) tanımlanmıştır (41).

Patogeneizde ilk adım bağırsak epitelinin *C. difficile* ile kolonizasyonudur. Konak hücresine adezyon, patojen kökenlerin virulansı için önemlidir. Virulansı fazla olan kökenlerin aderansı, virulan ve toksijenik olmayan kökenlerden çok daha fazladır. Toksin A fazla üreten kökenlerin toksin A az üreten kökenlere göre daha virulan olduğu tespit edilmiştir. Bu durum toksin A'nın bağırsak epiteli üzerinde kendine ait reseptörüne bağlanarak patogenezin ilk basamağını oluşturduğunun göstergesidir. Tüm olgularda aderansın en belirgin olduğu bölgeler terminal ileum, çekum ve kolondur (42, 43). *C. difficile* flajelası olup hareketlidir. Bağırsakta hücrelere bağlanmayı sağlayan yapılardan biri fimbriyalardır. Bu yapıların kolonizasyondaki rolü açık değildir. Mikroorganizmanın fizikokimyasal özellikleri de adezyona katkıda bulunur. *C. difficile*'nin hücre yüzeyi hidrofobiktir ve pozitif yük taşır. Negatif yüklü konak hücre duvarı ile ilişkisinin *C. difficile*'nin bağırsakta kolonize olmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [24].

C. difficile patogenezinde en önemli adımlardan biri, birçok adezyon faktörünün rol oynadığı kolonizasyondur. *C. difficile* kolonizasyonuna katkıda bulunan bu faktörler bakterinin bağırsak epitel hücrelerine ve bazı hücre dışı matriks bileşenlerine bağlanmasında rol oynarlar (15, 16). *C. difficile*'nin konak hücrelerine

aderansı yüzey proteinleri aracılığıyla olur. Kolonizasyon sürecinde yer alan farklı adezinler bulunmaktadır. Bu adezinler konakta hem inflamatuvar hem de antikor yanıtını uyarabilmektedir (44). *C. difficile*'nin kolonizasyon sürecinde önemli olduğu düşünülen adezinler, yüzey tabakası (SLP; S tabakası) ve hücre duvarı proteinleri (CWP)'dir. Yüzey tabakası proteinleri bakterinin bağırsak mukozasına aderansı için önemlidir. İn-vitro koşullarda aderansa en büyük katkıyı sağlayan SlpA proteindir. Hücre duvarı proteinleri, Cwp84 ve Cwp13 olarak bilinir. Cwp84, SlpA'yı ayrıştırıp işleyerek yüzey tabakası bütünlüğünde önemli bir rol oynar (19). Cwp13, Cwp84'ün işlevini doğru bir şekilde yapmasından sorumludur (45).

Bakterinin kolonizasyonunu sağlamada bir diğer önemli yapı peritriköz flagellasıdır (19). Tasteyre ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda *C. difficile* flagellasını kodlayan gen lokusunda flagellin monomeri (fliC) ve flagellar cap proteinini de (fliD) kodladığı bulunmuştur. Bu fliD proteini, mukusa bağlanmada görev yapmaktadır (46).

C. difficile'nin PS-1 ve PS-2 adlı iki hücre yüzey polisakariti tanımlanmıştır. PS-1 sadece NAP-1 kökeninde, PS-2 ise tüm kökenlerde bulunur. Yakın zamanda PS-1 ve PS-2 kimyasal olarak sentez edilmiştir ve her ikisinde de CDE'ye karşı aşılama potansiyel antijenler olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir polisakarit olan petidoglikan, yapısında varyasyonlar yaparak beta laktam antibiyotiklere ve lizozime direnç geliştirebilirler (19).

Kolonizasyonda rolü olduğu düşünülen fibronektin bağlayıcı proteinlerden (Fbp) Fbp68 ve FbpA *C. difficile* genomlarında tanımlanmışlardır (45).

C. difficile patogenezinde bir diğer önemli faktör, bakterinin spor oluşturmasıdır. Kolon dışındaki ortamda hayatta kalabilmek için spor oluşturur. CDE'li hastaların son derece bulaşıcı olan enfektif sporları dışkılarıyla yüksek oranda çıkarması ve sağlık çalışanları ve hastalar arasında sporların kolaylıkla yayılabilmesi özellikle hastane ortamında sorun oluşturmaktadır (19). Besinden zengin ortamda sodyum taurokolat ve sodyum kolatın *C. difficile* sporlarının germinasyonunu uyardığı uzun yıllar önce gösterilmiştir. Safra tuzları, *C. difficile* sporları için bilinen germinasyon faktörleridir (45). Antibiyotik tedavisi kesildikten sonra, barsağın kommensal bakterilerle yeniden kolonizasyonunun *C. difficile*'nin ürettiği ve diğer mikroplara karşı toksik özellikte olan para-krezol tarafından önlendiği ileri sürülmüştür. Tirozinin transaminasyonu ile oluşan bu bileşik bakteriyostatik

özelliğindedir. P-krezol oluşturma özelliği sadece birkaç bakteride görülür ve bu özellik ile diğer bağırsak florası bakterilerine karşı *C. difficile*'ye rekabet avantajı sağlayarak CDE gelişmesine katkıda bulunan önemli bir virülans faktörü olabileceği düşünülmektedir(16).

Toksinler hastalığın patogenezinde en önemli role sahip olsa da son bulgular kombinasyon halinde hareket eden *C. difficile* virülans faktörlerinin konağın inflamatuvar cevabını artırma potansiyeline sahip olduğunu ve toksin ve toksin dışındaki virülans faktörlerinin yanı sıra, mikrobiyomun bileşimi ve işlevi ile konak faktörlerinin CDE patogenezi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (47).

C. difficile kolitinde, kolonik mukozada masif nötrofil toplanması karakteristikdir. Psödomembranöz kolitte, nötrofilden zengin psödomembran ve mikroapsellerden oluşan inflamatuvar infiltrasyon gelişir (48). İnterlökin (IL)-1, IL-8, TNF alfa ve lökotrien B4 inflamatuvar bölge hücrelerinden salınan ürünler olup, nötrofillerin inflamatuvar bölgeye toplanmasında etkilidir. Her iki toksinde monositlerden TNF salınımını arttırmaktadır. Toksinler ayrıca, lamina propriada monosit ve makrofajları aktive ederek IL-8 salınımını arttırmakta ve böylece mukozada nötrofil ektravazasyonu ve doku infiltrasyonu ile kemotaktik gradient geliştirmektedir (49). Toksin A komşu duyuşal nöronlardan substrat P salgılatarak, mast hücrelerini de aktive ederek inflamasyonu ağırlaştırmaktadır (50).

C. difficile koliti biyopsilerinde, lamina propriada damar konjesyonu ve nötrofil infiltrasyonu belirgindir. Calderon ve arkadaşları, Toksin A'nın nötrofil, mast hücreleri ve makrofajları in vitro aktive edebildiğini göstermiştir (50). Az miktarda toksin nötrofilleri direkt aktive edemeyebilir ancak doku makrofajlarını aktive ederek IL-8 ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır. İnflamatuvar kaskat tetiklenince, belirgin akut inflamatuvar hücre infiltrasyonu gelişerek mukoza hasarı ve fokal psödomembran gelişimine yol açar (49).

2.2. Klinik

C. difficile, sağlıklı kişilerin yaklaşık %3-5'inin bağırsak florasında saptanırken, hastanede yatanlarda ise oran %20 civarındadır. Yenidoğanlarda ise gastrointestinal sisteminde %60-70 oranında kolonize olabilmektedir (7). Antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-25'inde etken *C. difficile*'dir (1). İlk olarak 1978 yılında antibiyotikle ilişkili ishal nedeni olarak rapor edilmiştir (51). Klinik tablo, kendini sınırlayan ishalden, PMC'ye kadar değişebilmektedir. PMC'lerin ise %99'undan *C. difficile* sorumludur (5). Önceleri klindamisin kullanımı ile ilişkilendirilen *C. difficile* kolitinin, kolon florasına etkili ampisilin, amoksisilin ve sefalosporinler gibi diğer antibiyotiklerin kullanımından sonra da ortaya çıktığı saptanmıştır (1).

Sağlıklı yenidoğanların %50'sinden fazlası *C. difficile* taşıyıcısıdır. Bu oran coğrafi özelliklere göre değişiklik gösterse de sağlıklı erişkinlerde %1 civarındadır. Antibiyotik tedavisi gören erişkinlerin %25'inin *C. difficile* ile kolonize olduğu saptanmış, ancak taşıyıcılığı belirleyen konak ve bakteriye ait faktörler tam olarak anlaşılammıştır. Kaynak görevi gören asemptomatik taşıyıcılar fekal yolla organizmayı etrafa yayarak çevreyi kontamine ederler ve daha duyarlı hastalara bulaşmayı sağlayarak enfeksiyon zincirini devam ettirirler. Taşıyıcılık oranları tedavi ile azalmaz. Bu sebeple taşıyıcılarda tedavi önerilmemektedir. Herhangi bir nedenden dolayı bu hastalar antibiyotik verilecek olursa, tedavi sırasında veya kullanımdan kısa süre sonra ishal gelişebilir (52, 53).

C. difficile ile ilişkili hastalıklar değişik klinik tablolar sergilemektedir. Antibiyotik tedavisi ile ilişkilendirilen *C. difficile* ishali ile antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishalin ayrımının yapılması önemlidir. Antibiyotik tedavisi bittikten 6-8 hafta sonrasında dahi semptomlar ortaya çıkabilmekte ve bu durum tanısal karışıklığa yol açabilmektedir (39, 54). Hastaneye yatıştan sonraki ilk 48 saatte veya hastane çıkışından sonraki 4 hafta içinde gelişirse toplum kaynaklı; hastane çıkışından sonraki 4-12 hafta içinde gelişirse başlangıcı belirsiz; çıkıştan 12 haftadan sonraki zamanda gelişirse yine toplum kaynaklı CDE, hastaneye yatıştan sonraki 48 saatte ortaya çıkarsa hastane kaynaklı CDE şeklinde sınıflandırılmaktadır (9). *C. difficile* ishali, sıklıkla karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette ishal ile kendini göstermektedir. Halsizlik ve ateş nadir de olsa görülebilmektedir. Antibiyotik tedavisi

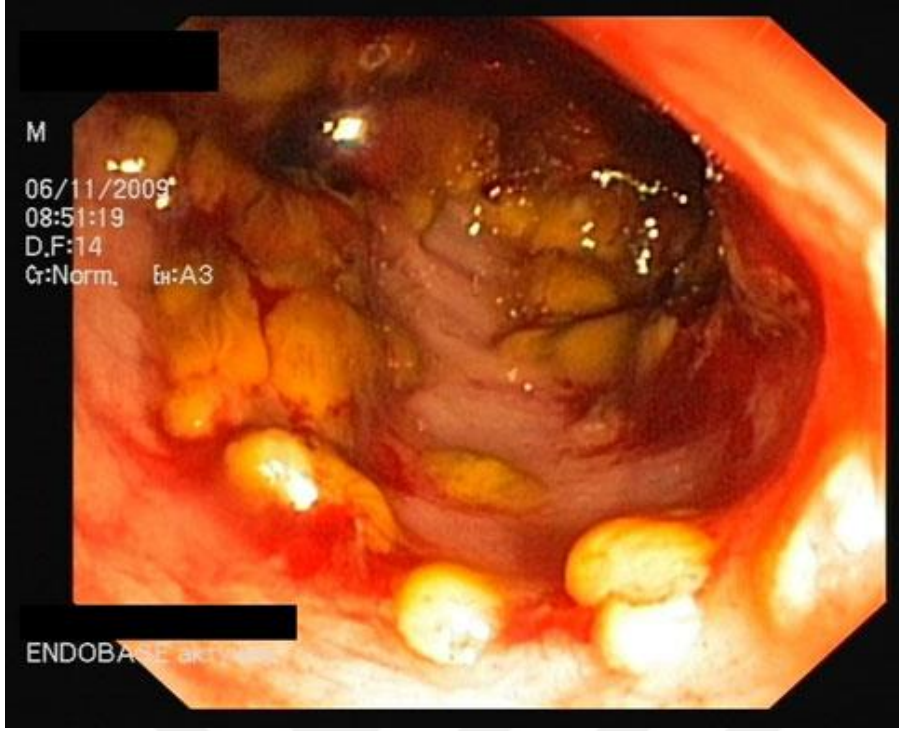
esnasında, kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra oluşabilmektedir. En önemli laboratuvar bulguları lökositöz ve hipoalbuminemidir (55).

C. difficile koliti, en sık görülen CDE tablosudur. PMC olmasa da klinik ciddi seyredebilmektedir. Hastalarda hafif ve orta şiddette karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık ve sulu ishal vardır. Sigmoidoskopide özgül olmayan yaygın veya yama tarzında psödomembransız eritematöz kolit tablosu görülebilmektedir (55) (Resim 2.1).



Resim 2.1. *Clostridium difficile* koliti, minör değişiklikler (34).

PMC, *C. difficile* kolitinin klasik tipi olarak bilinmektedir. *C. difficile* kolitinden daha ağır seyreder; hastalarda şiddetli ishal ile birlikte sağ veya sol alt kadranda yoğun bir rahatsızlık hissi vardır. Hastaların endoskopik muayenelerinde genellikle kalın bağırsak proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı şeklinde ve kolorektal mukoza boyunca psödomembran dağılımları görülebilmektedir (Resim 2.2). Laboratuvar bulgusu olarak beyaz kan hücresi sayısı 20.000/μl üzerinde albumin seviyesi ise 3.0 g/dl veya daha az olarak izlenmektedir (56).



Resim 2.2. PMC, sarı renkli plaklar (psödomembranlar) (35).

Fulminant *C. difficile* enfeksiyonu, ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüm gibi ciddi komplikasyonla seyredilmekte ve CDE'li hastaların %2-3'ünde görülebilmektedir. Hastalar birkaç saat gibi kısa zaman içinde veya haftalar içinde fulminan CDE tablosuna girebilir. Burada hastanın yaşı, immun durumu, altta yatan başka hastalıkları ve bakterinin toksin üretimi etkili olmaktadır. Hastalarda ishal, alt kadranda veya yaygın karın ağrısı ile birlikte şişkinlik vardır. Bazı hastalarda yüksek ateş, üşüme ve titreme belirtileri olabilmektedir. Kötü prognozlu hastalarda peritonit belirtisi olabilecek şiddetli karın ağrısı veya 50.000/µl üzerinde beyaz kan hücre seviyesi veya 5 mmol/l üzerinde laktat seviyesi vardır. Hastalığın kontrol altına alınmasında erken tanı ve tedavi büyük önem taşımaktadır (55). Rekürrent CDE, vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkması tablosu rekürrent CDE olarak adlandırılır. CDE'li hastaların %20'sinde rekürrens görülmektedir. Birinci rekürrensten sonra olguların %40'ında ikinci rekürrens, ikinci rekürrens oluşan hastaların %60'ında üçüncü rekürrens görülebilmektedir. Rekürrens görülen olgular, orijinal izolat (relaps) veya farklı izolat (reenfeksiyon) ile oluşabilmektedir. *C. difficile* enfeksiyonlarında, kan akımı enfeksiyonu, yara ve eklem enfeksiyonu gibi

enfeksiyonlar görülebilmektedir. Ayrıca irritabl bağırsak hastalığı ve reaktif artrit gibi reaktif veya postenfeksiyöz sendromlar ortaya çıkabilir (55).

Nozokomiyal diyare, hastanın hastaneye yatışından 72 saat sonra başlayan, en az 2 gündür devam etmekte olan günde 2 veya daha fazla sulu dışkılama olarak tanımlanmaktadır. Küçük çocuklarda, yaşlılarda ve yoğun bakım servislerinde insidans yüksektir; 70 yaşın üstünde en yüksek insidans (%17-31) ve en yüksek mortalite hızlarına (%21-83) sahiptir (11).

Nozokomiyal diyarelerin en sık enfeksiyöz nedenleri *C. difficile*'dir. Bunu sırasıyla, *Candida* türleri ve çocuklarda *Rotavirus* takip etmektedir. Toplumdan kazanılmış akut diyarelerde sık izole edilen *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterohemorajik Escherichia coli* ve *Campylobacter spp.* gibi bakteriler ise nozokomiyal diyarelerin sadece %1'inden sorumludur (57, 58).

AAD'lerin bir başka nedeni de *C. perfringens*'tir. Bu bakteri, insan ve hayvanların bağırsak floralarında bulunurlar. Sporları toprakta ve sedimentlerde canlılığını sürdürür ve bu bakteriye rastlanması fekal kontaminasyonun göstergesidir. Tespit edilen dört ana tip ekzotoksin mevcuttur. Bunlara alfa (α), beta (β), epsilon (ϵ) ve iota (i) adları verilmiştir. Bunların oluşturulma durumuna bağlı olarak *C. perfringens* suşları 5'e ayrılmış ve A, B, C, D, E adları verilmiştir. *C. perfringens* tip A; Alfa, Tip B; Alfa, Beta ve Epsilon, Tip C; Alfa ve Beta, Tip D; Alfa ve Epsilon, Tip E; Alfa ve iota toksinlerini salgırlar (59). *C. perfringens* tip A suşları, klinik olarak önemli olan bir enterotoksin (CPE) üretirler (60). Enterotoksinler CPE geni tarafından kodlanır. Tüm *C. perfringens* kökenlerinde bu gen bulunmayabilir. Bu geni bulunduran kökenler enterotoksin salgılayarak konak hücre membranında kanallar açarak etkisini göstermektedir ve bu gen plazmid üzerinde taşınır (61). *C. difficile* gibi *C. perfringens*'in CPE toksininde de AAD'ye neden olduğu bulunmuştur. Ancak *C. difficile*'nin aksine bağırsakta psödomembran oluşturmazlar (62). Tanıda dışkı örneklerinde enterotoksinin saptanmasında EIA veya vero hücre sitotoksisite testi kullanılır. Tanıda kültür kullanılmaz çünkü tüm kökenler enterotoksin üretmezler (63). Tedavi yaklaşımlarının farklılıklarından dolayı *C. difficile* ve *C. perfringens* diyarelerinin birbirinden ayrımının yapılması gerekmektedir.

2.3. Epidemiyoloji

Son yıllarda CDE, tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. 2001 yılının başlarında, CDE epidemiyolojisinde değişiklik olmuştur. Hastalığın sadece insidansı artmamış, şiddeti de artmıştır. Özellikle 65 yaş ve üzeri kişilerde 45-64 yaş grubuna göre 5 kat daha fazla artış gözlenmiştir (9).

Antibiyotiğe bağlı ishal etkeni olan *C. difficile*, fekal oral yolla bulaşır. Sporları hastanelerde tuvalet, küvet, yer zeminlerinde, termometre, tansiyon aleti manşonunda sık olarak saptanabilmekte ve semptomatik hasta taburcu edildikten sonra hasta odalarında ve yer zeminlerinde aylarca canlı kalabilmektedir. Ancak vegetatif formu, bağırsak dışında 24 saat içinde ölmektedir. Hastalar sıklıkla hastanede yatan hastaların çevresinde bulunan sporların varlığı nedeni ile kolonize olabilirler. Sporları gastrik aside dirençlidirler. *C. difficile* hastane personelinin elleri ile hastadan hastaya taşınabilir. El yıkama, eldiven kullanımının artırılması bulaşı önlemek için doğrudan hastalarla temas olan yoğun bakım ünitelerinde özellikle çok önemlidir. Enfeksiyon için bilinen önemli risk faktörü enfekte hasta ile aynı odayı paylaşmaktır. Böylece hastadan hastaya veya çevreden hastaya çapraz bulaşma ile enfeksiyon gelişebilmektedir (64).

Quebec Kanada'da, 1991 ile 2003 yılları arasında yapılan retrospektif bir çalışmada CDE insidansı, her 100.000 kişide 35.6'dan 156.3'e çıkmıştır (65). Kasım 2004 ile Nisan 2005 yılları arasında yapılan başka bir çalışmada da her 1000 kişi için bu oran 4.6 olarak bulunmuştur (66).

Avrupa'da CDE insidansı ile ilgili ilk çalışma, Avrupa Clostridium Difficile Çalışma Grubu (ESGCD) tarafından yapılmıştır. 2002 yılında 212 hastanenin katıldığı bu çalışmada CDE insidansı her 10.000 kişide 11 olarak bulunmuştur (67).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda da Amerika, Kanada ve Avrupa'da CDE insidansının dramatik bir artış gösterdiği görülmüştür (66, 68). Amerika'da görülme sıklığında artış 3.5 kat, mortalitedeki artış ise 4 kat olmuştur (69). Ayrıca çocuklarda ve sağlıklı bireylerde de CDE oranlarında artış olduğu belirtilmiştir (70). Bu artış, hipervirulan epidemik bir *C. difficile* kökenine bağlanmıştır. Bu kökene, restriksiyon endonükleaz analiz paterni ile BI, pulsed-field jel elektroforeziyle NAP1, PZR ribotiplendirmesine göre de 027 kökeni adı verilmiştir. Günümüzde BI/NAP1/027 olarak adlandırılmaktadır (9). Bu suş, hızlı yayılma ve hipervirulan olma özelliklerine

sahiptir. Bu kökende tcdC geninde mutasyon olup, diğer *C. difficile* kökenlerine göre 16 kat daha fazla toksin A ve 23 kat daha fazla toksin B üretmektedir (71). Ayrıca binary toksin adında üçüncü bir toksini de bulunmaktadır (72). Binary toksinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak toksin A ve B ile birlikte daha ciddi hastalıklara neden olduğu kabul edilmektedir (73). Diğer bir özelliği de florokinolon grubu antibiyotiklere olan direnciyle daha çok yayılma gösterebilmesidir (72). Son bilgilere göre bu kökenin sporulasyonu ile diğer kökenlerinki arasında fark yoktur (74).

2.4. Risk Faktörleri

CDE gelişimine neden olan en önemli değiştirilebilir risk faktörü, antimikrobiyal ajanlara maruz kalmadır. Antimikrobiyal ajanlar, normal bağırsak florasını baskılayarak *C. difficile*'nin baskın hale gelmesine neden olurlar. Antimikrobiyallerin uzun süre ve çoklu kullanımı bu riski artırmaktadır (9). En sık klindamisin, penisilinler, sefalosporinler ve florokinolonlar hastalığa yol açsa da hemen hemen tüm antimikrobiyaller bu hastalıkla ilişkilidir. 1989 ve 1992 yılları arasında klindamisin kullanımına bağlı, klindamisin dirençli suş kaynaklı salgınlar görülmüştür. Son dönemlerde ise florokinolonlara dirençli olan BI/NAP1/027 suşuna bağlı salgınlar görülmektedir. 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, dar spektrumlu penisilinlere (penisilin V ve G) göre daha fazla bu hastalıkla ilişkilidir. Antibiyotik kullanımında kısıtlama ile CDE insidansında azalma gözlenmiştir.

Kanser kemoterapisi diğer bir risk faktörüdür. Doksorubisin, sisplatin, siklofosamid, 5-florourasil, klorambusil ve metotreksat gibi ilaçlar bu hastalığa yol açabilmektedir (75).

Önemli risk faktörlerinden birisi ilerlemiş yaştır. 65 yaş ve üstü kişilerde CDE görülme riski diğer yaş gruplarından 5 kat daha fazladır. İleri yaş, rekürren enfeksiyon ve salgınlar için de önemli bir risk faktörüdür (76, 77).

İleri yaşa ek olarak hastanede kalış süresi ve *C. difficile*'ye maruziyet de risk faktörlerindedir (9).

Gastrointestinal cerrahi, nazogastrik tüple beslenme, inflamatuvar bağırsak hastalığı, gastrik asidin azalması olası risk faktörlerindedir (9, 78-82). Gastrik asitin azalmasına bağlı hastalık gelişimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bazı çalışmalarda proton pompa inhibitör (PPI) ve histamin reseptör-2 blokörlerine (H-2B)

bağlı gastrik asit azalmasıyla hastalık geliştiği bildirilmiştir (83-85). Yapılan iki meta analize göre, PPI ve H-2B kullanımı ile CDE arasında ilişki olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (86-88). Ancak PPI kullanımının, rekürren CDE'ye neden olmadığı gösterilmiştir (89).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre antidepresan ilaç kullanımı da CDE gelişmesinde rol oynamaktadır (90, 91).

İmmünolojik yanıt da CDE oluşumunda kritik öneme sahiptir. Konağın immunglobulin G cevabı semptomatik hastalığa ve relapsa karşı korumaktadır (75). İmmüsupresyon olan durumlarda (malignitesi olanlar, kortikosteroid tedavisi alanlar, transplantlı hastalar, siroz gibi) CDE insidansı artmaktadır (78).

2.5. Tanı Yöntemleri

Hastalarda 36 saatte en az altı sulu ishal, 48 saat içinde sekizin üzerinde şekilsiz ishal veya iki gün için günde üç şekilsiz ishal olması klinisyenlere CDE varlığını düşündürmelidir (92).

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı CDE'lerin kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir. CDE tanısı, antibiyotik kullanım öyküsü olan ishali hastalarda, laboratuvar bulgularıyla desteklenerek konulan klinik bir tanıdır. Hastanede AAD gelişen hastaların yaklaşık %30'unda neden CDE oluş nedenini saptamaya yönelik tanı testlerini yapmadan ampirik tedavi uygulanması uygun değildir. Asemptomatik taşıyıcılarda yalancı pozitiflik görüleceği için tanı testlerinin yapılması önerilmemektedir (9).

C. difficile toksinleri ısıya hassas olduğundan dışkı laboratuvara buz içinde gönderilmelidir; dışkı çalışma zamanına göre buzdolabında 2-3 gün, daha uzun süre bekletilecekse -70°C 'de saklanmalıdır. Oda ısısında ve -20°C 'de toksin zamanla azalmaktadır. Sitotoksin aktivitesi 22°C 'de saklanan dışkılarda 2 log azalmaktadır. Bunun dışında ishali olmayan yani şekilli (solid) dışkıda toksin araştırılması ishalsiz ileuslu hastalarda örnek olarak kullanılabilir. Semptomların başlangıcında alınan bir veya iki örnek genellikle tanı için yeterlidir. Eğer birinci örnek negatif ise ilave dışkı örneği ile testin tekrarlanması faydalı olabilir. Üç farklı dışkı örneğinin test edilmesi pozitiflik olasılığını %10 civarında arttırmasına rağmen maliyeti yükselttiğinden dolayı tavsiye edilmemektedir (9).

Tanıda; endoskopik inceleme, radyolojik incelemeler düz karın grafisi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve laboratuvar tanı metotlarına başvurulur.

2.5.1. Endoskopik inceleme

İnvaziv, pahalı ve uzman gerektiren bir yöntemdir. Endoskopik incelemede eritemli, ödemli, ciddi inflamasyonlu ortamda, özgül psödomembranlar görülür; yüzeyden kabarık 2-10 mm çapında normal mukoza ile çevrili lezyonlar tipiktir; ciddi olgularda lezyonlar plaklar oluşturmak üzere birleşir. Histopatolojik incelemede plakların fibrin, mukus, nekrotik epitel hücreleri ve lökositlerden oluştuğu görülür. Daha hafif seyirli olgularda plak oluşumu görülmez; sadece yaygın mikroskobik kolit saptanır (93).

Genellikle distal kolon tutulduğundan olguların çoğunda (%65-70) sigmoidoskopi yeterli olmaktadır. Olguların 1/3'ünde lezyonlar sağ kolonda yerleşir ve bu durumda kolonoskopi gereklidir.

Endoskopik inceleme invaziv, pahalı ve uzman gerektiren bir yöntemdir. PMC'de duyarlılığı %51, özgüllüğü yaklaşık %100 olarak bildirilmektedir. Sitomegalovirüs (CMV) kolitinde de PMC görünümü olabileceği hatırlanmalıdır (94).

2.5.2. Radyolojik inceleme

Direkt radyolojik incelemeler genelde özgül olmayan bulgular verir. Kolitli olgularda düz grafide distansiyonla birlikte belirgin ödem ve haustraların görüntüsünün bozulmuş olduğu saptanır (94, 95).

BT genellikle komplike CDE olgularında kullanılmalıdır. BT'de kolona sınırlı değişiklikler saptanır. Kolonda 4 mm'den fazla kalınlaşma, bir veya daha fazla perikolonil 'stranding', kolon duvarında nodüler haustral kalınlaşma (akordiyon bulgusu), başka bir nedenle izah edilemeyen asit BT ile saptanan değişikliklerdir. Değişiklikler fokal veya pankolonik olabilir. BT'nin duyarlılığı %52-88, özgüllüğü %48-93, pozitif tahmin değeri %88, negatif tahmin değeri %67 olarak saptanmıştır (14).

2.5.3. Laboratuvar metodları

C. difficile tanısında duyarlılıkları farklı olan değişik klinik mikrobiyolojik metotlar kullanılır. Mikroskopik inceleme, kültür, sitotoksinite veya immünolojik metotlarla Toksin A/B aranması, moleküler metotlar, kromotografik teknikler bunlar arasındadır (96).

2.5.3.1. Mikroskopik inceleme

Antibiyotikle ilişkili ishal dışındaki tablolarda dışkıda eritrosit ve lökositler vardır. Dışkı Gram boyamasında, floranın değiştiğini gösteren baskın bakteri imajı görülebilir, ama duyarlılık ve özgüllük sorunları vardır (97). Direkt floresan antikor yönteminin toksin araştıran testlere %92 uyumlu olduğu saptanmış, ama aynı yöntemle sağlıklı kişilerde %62 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Yalancı pozitifliğin nedeni *C. difficile* ile ortak antijenlere sahip *C. bifermetas* / *C. sordellii*'dir (96).

2.5.3.2. Hücre kültürü sitotoksinite nötralizasyon deneyleri

Uzun dönemdir hücre kültürü sitotoksinite yöntemi klinik örneklerde toksin (toksin B) varlığını direkt olarak gösterdiği için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle toksin B'nin 10pg miktarı tespit edilebilir. Toksin varlığının *C. difficile* veya çapraz reaksiyon veren *C. sordellii* antitoksini ile doğrulanması gerekmektedir. Sitotoksin tespitinde Vero hücreleri, Hep 2 hücreleri, Mc Coy hücreleri, insan diploid ve MRC-5 akciğer fibroblast hücre kültürleri kullanılmaktadır (98). Bu hücrelerde 24-48 saatlik inkübasyondan sonra sitotoksine bağlı sitopatik etki gözlemlenir. Sitopatik etki gözlenirse, hem *C. sordellii* hem de *C. difficile* antiserumları kullanılarak nötralizasyon deneyleri uygulanır. Öncelikli olarak toksin B'yi saptayan bu yöntem bazı ölçümlerde toksin A'yı da saptayabilmektedir. Bu yöntemin performansını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Örneğin transportunda gecikme olursa, örnekteki toksin indirgeneceği için yanlış negatif sonuçlar oluşabilir (99). Testin özgüllüğü yüksek (%97), duyarlılığı %75-85 arasında olup, toksijenik kültürden daha düşük duyarlılığa sahiptir. Pahalı, zaman alıcı olması ve hücre kültür alt yapısını gerektirdiğinden rutin laboratuvarlar tarafından tercih edilmemektedir (100, 101).

2.5.3.3. Kültür

Anaerobik dışkı kültürleri, *C. difficile* tanısı için en duyarlı testtir. Test ucuzdur, ancak 2 ila 5 gün arasında sonuçlanmaktadır. Hücre kültürü ile kombinasyonunda, yüksek duyarlılık (%94-%100) ve özgüllüğe (%99) ulaşır (102). Kültür için fekal örnek, dışkı, rektal swab veya perirektal swab uygun örneklerdir (103).

En sık kullanılan besiyeri CCFA'dır. *C. difficile* indikatörlü CCFA besiyerinde UV lambası altında incelendiğinde floresans veren, yaklaşık 2-4 mm çapında, altın sarısı renginde koloniler oluşturur (Resim 2.3). *C. difficile*, kanlı agar besiyerinde, 48 saatlik anaerob inkübasyonu takiben, hemolizsiz, at dışkısı kokusunda, sarımsı-yeşil floresans veren yaklaşık 2-4 mm çapında, koloniler oluşturmaktadır (39).



Resim 2.3. *C. difficile*'nin CCFA besiyerindeki görüntüsü (104).

Gram boyamada koloniler tipik olarak gram pozitif veya gram labil basil olarak görülmektedir. Kültürde üreyen kolonilerden, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption İonization-Time of Flight Mass Spectrometry) kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir. *C. difficile*'nin AAD'ye neden olduğunun anlaşılmasından sonra çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunu arttırmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Dışkının 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırılmasının ardından oda ısısında en az 45 dakika bekletilmesiyle (alkol şok

yöntemi), kontaminant çoğu bakterinin öldüğü ve *C. difficile* izolasyonunun önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (99). Sodyum taurokolatın da *C. difficile* sporlarının vegetatif forma geçmesini kolaylaştırdığı ve %0.2 oranında CCFA besiyerine eklenen sodyum taurokolatın, örneklerdeki az sayıdaki *C. difficile*'nin saptanmasında yararlı olduğu görülmüştür (39).

Konvansiyonel kültür yöntemlerine ek olarak *C. difficile* için kromojenik besiyeri de geliştirilmiştir. Bu besiyeri renklenme yaparak *C. difficile* tanısını kolaylaştırmaktadır (105). Kromojenik besiyeri, içinde bulunan özel kromojenik substratlardan dolayı diğer besiyerlerinden daha pahalıdır (99).

Kültürün duyarlılığı yüksektir. Ancak, yöntemin kompleks oluşu, toksijenik ve nontoksijenik suşları ayırt edememesi gibi nedenlerle merkezi laboratuvarlarda uygulanır ve daha çok salgın zamanlarında epidemiyolojik açıdan önem kazanır (99).

Tek başına kültür pozitifliği, kolonizasyon ile infeksiyonu ayıramaz (99). Bu nedenle toksijenik kültür kullanılmalıdır. Toksijenik kültürde, ilk olarak bakteri kültürde üretilir ardından EIA yöntemiyle veya PZR ile toksin varlığına bakılır. Sonuç için 4-7 gün gereklidir. Hücre kültürü sitotoksitesi nötralizasyon yönteminden daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Bu yüzden altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ancak, *C. difficile* suşlarının toksin üretme yeteneğini in vitro gösterdiği için gerçekte dışkıda toksin olmasa da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Asemptomatik taşıyıcılarda da test sonucu pozitif olabilmektedir (78).

2.5.3.4. Enzim temelli immünolojik yöntemler (Enzim İmmunoassay EIA)

Enzim temelli immünolojik yöntemler ilk kez 1984 yılında *C. difficile* toksin A veya *C. difficile* toksin A ve B'yi tespit etmek için kullanılmıştır (18). Hastalıktan sorumlu *C. difficile* toksinlerini saptayan immünokromotografik/lateral flow membran immunoassay, microwell ve solid faz testleri gibi çok sayıda ticari EIA testleri geliştirilmiştir.

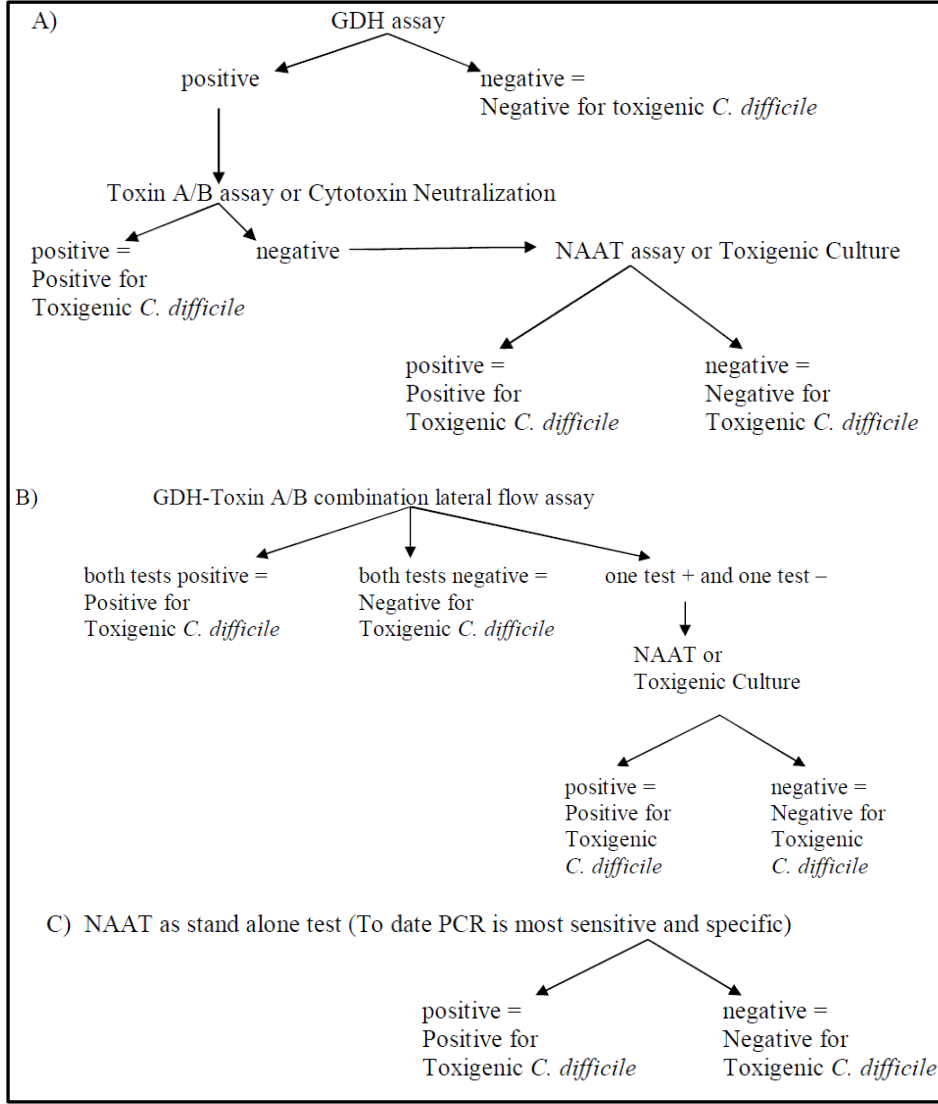
Dışkıda *C. difficile* toksinlerinin saptanması amacıyla yönelik olarak önceleri sadece toksin A'yı saptayan kitler geliştirilmiştir ancak şimdi önerildiği gibi hem toksin A hem de toksin B'yi saptayabilen birçok ticari kit üretilerek ToksinA-/ToksinB+ suşlarında saptanması sağlanmıştır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri (%40-%100) oldukça değişkendir.

Antibiyotikle ilişkili ishalde duyarlılıkları düşüktür (%34), antibiyotikle ilişkili kolitte %70'leri aşan duyarlılık gösterirler.

PMC olgularında hemen daima pozitif sonuç alınmaktadır. EIA ile 100-1000 pg seviyesinde Toksin A veya B saptanabilmektedir (94). Yanlış pozitif sonuçların çokluğu, yanlış negatif sonuçlar kadar problem yaratabilir (99).

EIA testlerinin kısa sürede sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin daha kolay, bunun yanı sıra ucuz olması nedeniyle klinik laboratuvarlar da alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir (78). Bu yöntemin temelinde, *C. difficile*'ye karşı gelişmiş monoklonal veya poliklonal antikorların tespiti bulunur (99).

C. difficile toksinleri dışında, hem toksin oluşturan hem de oluşturmayan *C. difficile* kökenlerinin ürettiği metabolik enzim olan glutamat dehidrogenazı (GDH) tespit eden EIA testleri de vardır (106). GDH, *gluD* geni tarafından kodlanan metabolik bir enzimdir. Bu antijen *C. difficile* kökenleri tarafından fazla miktarda üretilmektedir. Toksin üreten ve üretmeyen kökenleri ayıramadığından pozitif sonuç elde edildiğinde toksin EIA testleri veya moleküler testlerle doğrulanması gerekmektedir (99). Bu antijen *C. sordellii* ile çapraz reaksiyona neden olabilir. Çoğu laboratuvar ilk basamağında GDH testi olan iki basamaklı algoritmayı kullanmaktadır. Bu algoritmada ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise takibinde toksin testi yapılması gerekmektedir. Bazı EIA kitleri, GDH ve toksini birlikte saptamaktadır. Bu kombinasyon, oldukça hızlı ve moleküler yöntemlerden çok daha ucuzdur. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise, ya hasta toksijenik olmayan bir *C. difficile* taşımakta veya toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir. Her iki test de pozitif ve hasta da semptomatik ise CDE tanısı konulmaktadır (107). Bir diğer algoritmada ise üç basamak kullanılmaktadır. Bu algoritmada, GDH testi pozitif ve toksini negatif olan örneklerle nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) veya toksijenik kültür uygulanır. NAAT veya kültür pozitif çıkarsa toksijenik *C. difficile* olarak raporlanmaktadır (108, 109). American Society for Clinical Microbiology (ASM) tarafından önerilen algoritmalar Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. ASM'nin tanı için önerdiği algoritmalar.

2.5.3.5. Moleküler tanı yöntemleri

C. difficile tanısında dışkı örneklerinde NAA Yöntemleri, 1990 yılının başlarında kullanılmaya başlanmıştır (110, 111). Bu yöntem klinik örneklerdeki az miktardaki *C. difficile* DNA'sının amplifikasyonu sonucunda saptanabilir hale getirilmesi temeline dayanmaktadır (8).

Günümüzde Real Time PZR sistemleri kullanıma girmiştir. Bu sistemler, *C. difficile* tanısında sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. *tcdB*; *tcdA*; *tcdB*, *cdtA*, *tcdC* nt 117 deletion; *tcdA*, *tcdB*, *cdt* nt 117 delesyonu FDA (Food and Drug Administration) onayı almış moleküler testlerin hedefleridir. PZR testleri, 45-180 dakika arasında sonuç vermektedir (15). Duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %99'a yakın bulunmuştur (102, 112).

Direkt dışkı örneğinden çalışılabilmesi en önemli avantajıdır. Fakat bu yöntem ile dışkının transportunun gecikmesi gibi durumlar sebebi ile çeşitli inhibitörler salınmakta ve bu sebeple PZR ile sonuç elde edilemeyebilmektedir (97).

C. difficile kökenlerinin PZR ile spesifik toksin A, toksin B ve “binary toksin” primerleri ile toksin gen durumu saptanabilmekte ve bu kökenler içerisinde varyant kökenler var ise bunlar tespit edilmektedir (99).

2.5.3.6. Kromatografik yöntemler

Dışkıda uçucu bileşikler; gaz likit kromatografisi (GLK), gaz kromatografisi ve kitle spektroskopisi kullanılarak araştırılabilir (113). GLK ile dışkıdan *C. difficile* için özgül kalıp (izovalerik asit, izokaproik asit veya p-krezol) saptanarak tanı konulabilir. Bu yöntem sitotoksin ve kültür sonuçları ile %61 uyumlu bulunmuştur. Metot pahalı teknik gerektirir. Ancak araştırmacılar GLK'nın *C. difficile* için iyi bir tarama metodu olabileceğini belirtmiştir (39). Solid faz mikro ekstraksiyon ile elde edilen gaz bileşimi, gaz kromatografisi ve kitle spektroskopisi kullanılarak da analiz edilir. Uçucu gazların özgül kalıbı *C. difficile* ilişkili ishal tanısına katkı sağlar. İndolsüz furan türleri *C. difficile* için özgüldür. Metotla hızlı sonuç alınır. Rotavirüs ve diğer enterik virüslerin ve *Campylobacter* spp.'nin tanısı için de uygundur ama kromatografi-kitle spektroskopisi gerektirmektedir (113).

2.5.3.7. Yardımcı laboratuvar testleri

Fekal laktoferrin, 2 yaşından küçük anne sütü alan bebeklerin dışkılarında görülebilen demir bağlayıcı bir proteindir (114). Bu protein nötrofil aktivasyonu ile salınır ve proteolize dirençlidir. İntestinal bakterilerle indirgenmez (115). Fekal laktoferrin düzeyi, *C. difficile* enfeksiyonunda yükselir (116). Hatta bazı çalışmalar sonucunda algoritmelerde ilk sırada yer alması gerektiği düşünülmüştür (115).

Fekal kalprotektin, nötrofillerin sitoplazmalarında bulunan, kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Bağırsakların inflamatuvar hastalıklarında dışkıda bu protein salgılanır ve bakterilerle indirgenmez. Çalışmalar, bu proteinin oda ısısında dışkıda 7 gün kalabildiğini göstermiştir (117).

Sonuç olarak bu iki protein, bağırsak inflamasyonlarında nonspesifik belirteç olarak kullanılabilirler. CDE'de de bu iki belirteç artmıştır (99).

2.5.3.8. Biyokimyasal testler

C. difficile ilişkili ishal seyrinde lökositöz saptanabilir (ortalama 15.000/mm³); hatta bazen lökomoid reaksiyon da olabilir. Özellikle yaşlı ve düşükün hastalarda ishal aşırı protein kaybına neden olabilir; sonuçta hipoalbuminemiye, kolesterol ve transferin düşüklüğüne neden olabilir; ayrıca bu hastaların dışkıında alfa-1 antitripsin yüksektir (39). Sekretuar veya kanlı, mukuslu olabilen dışkı makroskopik ve mikroskopik olarak incelenir. Dışkıda anlamlı sayıda lökosit %40-50, laktoferrin pozitifliği %60-80 olguda saptanır; lökosit saptanmasının özgüllüğü %92 düzeyindedir (118).

L-Proline Aminopeptidaz enzimi, *C. difficile* tanısında kullanılan diğer bir biyokimyasal testtir. Bu enzim *C. difficile*'de pozitifdir ve hızlı bir disk testi ile gösterilebilir. Disk testinde L-Proline-beta naftilamid ve p-dimetilaminocinnamaldehyd varlığına bakılmaktadır (119).

2.6. Tedavi

Tedavide en önemli yaklaşım hastalığa neden olduğu düşünülen antibiyotiğin kesilmesidir. Orta şiddetteki CDE'nin %25'inde 48 saat içinde semptomlarda azalma görülmektedir.

Hastalara sıvı ve elektrolit takviyesi yapılmalıdır. Eğer antibiyotiğe devam edilmesi zorunlu ise klindamisin, sefalosporinler veya geniş spektrumlu penisilin dışı antibiyotiklerin tercih edilmesi önerilmektedir. Bağırsak hareketlerini azaltan antiperistaltik ajanlardan kaçınılması gerekir. Bir hastada laboratuvar testleri yapılmadan önce, klinik olarak CDE'den şüpheleniliyorsa ampirik tedaviye başlanılmalıdır. En çok kullanılan iki antibiyotik metronidazol ve vankomisin olup üçüncü sırada ise fidaksomisindir. FDA, Mayıs 2011 tarihinde fidaksomisinin *C. difficile* nedenli ishallerin tedavisinde kullanımına onay vermiştir (78). Bu antibiyotik, bakteri RNA sentezini başlangıç aşamasında inhibe ederek etki gösterir (120). Tedavi maliyeti yüksek olmasına rağmen, yüksek riskli gruptaki hastalarda rekurent CDE oranını düşürdüğü ve toksin üretimini azalttığı için önemli bir antibiyotiktir (121).

Hafif ve orta şiddetli CDE olgularında, başlangıç tedavisi olarak 10 gün boyunca, günde üç kez 500 mg oral metronidazol başlanır. Bu olgularda kullanılan diğer bir ilaç da fidaksomisindir. On gün boyunca günde iki kez 200 mg oral olarak kullanılır. Metronidazol intoleransı veya alerjisi olanlar, hamile veya emziren kadınlar ve şiddetli CDE olgularında ise 10-14 gün boyunca günde dört kez 125 mg oral vankomisin kullanılır. Ciddi seyreden komplike CDE olgularında yüksek dozda yani günde dört kez 500 mg oral vankomisin alımı önerilmiştir (9, 122). Ciddi seyreden CDE olgularında destekleyici tedavi gerekmektedir. Bunlar, intravenöz sıvı tedavisi, elektrolit replasmanı ve venöz tromboemboli profilaksisidir (78, 123).

Bazı komplike hastalarda ise cerrahi müdahale gerekmektedir. Vazopressör tedaviye rağmen hipotansiyonu devam edenlerde, sepsis ve organ disfonksiyonu gösteren hastalarda, mental durum değişikliği olanlarda, beyaz küre sayısı 50.000 üzerinde olanlarda, laktat düzeyi 5 mmol/l olanlarda cerrahi tedavi yapılmaktadır (124-126).

Rekurrent CDE olgularının tedavisi ise; ilk rekurrenste, başlangıç tedavisine devam edilir. Ciddi ise vankomisin kullanılır (9). İkinci rekurrenste, pulsed vankomisin kullanılır (9). Pulsed vankomisine rağmen üçüncü rekurrens görülürse intestinal mikrobiyal flora transferi önerilir. Ayrıca, ciddi primer CDE olgularında da kullanılmaktadır. Fekal transplantasyon, alternatif tedavi yaklaşımı olarak kolon florasını tamir etmek amacıyla sağlıklı vericilerden alınarak uygulanmaktadır (25, 26, 127, 128). Rekürrent CDE tedavisinde yardımcı tedavi olarak probiyotikler de kullanılmaktadır. Probiyotiklerin kullanılmasının özellikle kolon florasının dengesini sağlayarak CDE önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (129, 130).

Hipogamaglobulinemili hastalarda yardımcı tedavi olarak immunoterapi de kullanılmaktadır (131, 132). Bu amaçla son dönemlerde toksin bazlı aşı uygulamaları geliştirilmiştir. Toksin A ve B'nin her ikisini de içeren aşılardan etkinliği, sadece toksin A içerenlerden çok daha etkili olduğu bulunmuştur (133). Aşı, antitoksin A IgG antikorlarının serum düzeylerini rekurrent CDE olgularında arttırmıştır (134, 135).

CDE için kullanılması olası diğer antibiyotikler arasında, tigesiklin, rifaksimim, nitazoksanid ve fusidik asit sayılabilir.

Gelişmekte olan ilaçlar ise, LFF 571, Surotomisin (CB-183,315), SMT19969, Cadazolid (ACT 179811), Oritavancin 'dir (136).

2.7. CDE İçin Enfeksiyon Kontrol ve Korunma

C. difficile enfeksiyonu gelişenlerde hastalık yalnızca bu kişilerin kendileriyle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda hastane içinde diğer hastalar ve hastane dışında da bu hastaların yakın çevresi için bakteri yayılımına neden olabileceğinden bir tehdit oluşturur. Bu kişiler, hastane personeli, diğer hastalar ve çevrenin *C. difficile* ile kontamine olmasında kaynak rolü üstlenir. Yayılım, CDE gelişmeksizin de görülebilir. CDE açısından en riskli yerler hastaneler ile yaşlı ve düşkünlerin günlük bakım merkezleridir. Günümüzde CDE'den korunma ve enfeksiyon kontrolü için üç ana yol izlenmektedir. Bunlar; enfeksiyon kontrol önlemleri, çevresel dezenfeksiyon ve antibiyotik yönetimidir.

2.7.1. Enfeksiyon kontrol nlemleri

C. difficile oldukça bulaşıcı bir bakteridir. Hastane personeli, enfekte bir hastayı beslemek ya da vücut ısısını ölçmek gibi düşük riskli bir aktivite esnasında da bakteriyi kazanabilir. Hastayla temas sırasında eller sıklıkla kontamine olur; yalnız başına el yıkamak *C. difficile* bulaşını önleyemeyebilir. O yüzden sağlık çalışanları ve ziyaretçiler, CDE'li hasta odalarına girerken eldiven ve önlük giymelidirler. El hijyeninin önemi vurgulanmalıdır. Salgın durumlarında veya CDE olgularının oranlarının artması durumlarında, sağlık çalışanlarını ve ziyaretçileri, sabunla veya antimikrobiyal sabunlarla ellerini yıkamaları konusunda bilgilendirilmelidirler. CDE'li hastalar, mümkünse özel ayrı bir odaya alınmalıdır. Eğer bu mümkün değilse her hastanın kendine ait ayrı bir komidini olması gerekmektedir.

2.7.2. Çevresel temizlik ve dezenfeksiyon

Çevresel temizlik ve dezenfeksiyon CDE kontrolü için önemli bir faktördür. Olası kontamine yerler için, klor içeren bileşikler veya vaporeze hidrojen peroksit kullanılabilir. Rutin olarak *C. difficile* taramasının yapılması önerilmez. *C. difficile*'nin önemli bir bulaş nedeni de rektal termometrelerdir. Yeterli dezenfeksiyonun yapılamadığı durumlarda hastalar arasında *C. difficile* bulaşının önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. CDE'lerden korunmak için hastanın rektal ateş ölümünün tek kullanımlık rektal termometrelerle yapılması ya da rektal ateş ölümünden vazgeçilmesi bulaşın önüne geçilmesinde en etkili yöntemdir.

Rektoskopi, sigmoidoskopi ya da çeşitli endoskopik girişimlerin ardından yeterli dezenfeksiyonun yapılması ile bulaşıcılık önemli ölçüde azaltılabilir. Bu amaçla alkalin gluteraldehidin %2'lik solüsyonunun 20 dakika süresince uygulanmasının fiberoptik endoskop ve diğer yarı kritik cihazların dezenfeksiyonunda başarılı olduğu gösterilmiştir (78)

2.7.3. Antibiyotik kullanımı yönetimi

Uygulanan antibiyotik politikasında;

- Antibiyotik kullanım rehberi bulunmalı,
- Mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından sınırlı antibiyotik duyarlılık sonuçları bildirilmeli,
- Klinisyenlere yönelik eğitim programlarını içermeli,
- Gereğinden fazla ilaç reçete edilmemeli,
- Antibiyotik kullanımları öngörülen zamanda sonlandırılmalı,
- Özel durumlarda infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanı tarafından hastanın konsülte edilmesi sağlanmalı,
- Gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılmalı,
- Mümkün olduğunca dar spektrumlu antibiyotik kullanımına özen gösterilmeli,
- *C. difficile* infeksiyonlarını arttıran belirli antibiyotik kullanımları sınırlandırılmalı,
- Cerrahi profilakside antibiyotik kullanımının kontrol altına alınması sağlanmalı,
- Düzenli reçete kontrolleri ile antibiyotik kullanımları mümkün olduğunca en erken sürede sonlandırılmalıdır (137).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırma Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 9 Nisan 2013 tarihinde, 63 sayılı karar numarası ile onaylanmıştır. 2013.04.0103.009 numaralı Tıpta Uzmanlık Tez Proje çalışması, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışma kapsamına, Haziran 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı EIA Birimi'ne *C. difficile* Toksin A/B isteği ile gönderilen dışkı örneklerinden, en az üç gündür hastane yatışı olan, öyküsünde son sekiz haftada antineoplastik veya antibiyotik kullanımı bulunan ve 24 saat içinde üç veya daha fazla sulu dışkılaması iki yaş ve üzeri 200 hasta alınmıştır.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi SPSS istatistiksel programı ile yapılmıştır.

Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanılmıştır ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyine göre değerlendirilmiştir.

3.4. Kültür

Kültür için *Clostridium Difficile* Selektif Agar (CDSA) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) besiyeri kullanılmıştır.

Bu besiyerinin içerdiği maddeler ve bunların miktarları şöyledir;

1 litre saf su için yaklaşık formül;

Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	32,0 g
Mannitol	6,0 g
Monopotasyum Fosfat	1,0 g

Disodyum Fosfat	5,0 g
Sodyum Klorür	2,0 g
Gelişim Faktörleri	3,3 g
Magnezyum Sülfat	0,1 g
Agar	20,0 g
Nötral Kırmızı	0,03 g
Sikloserin	0,25 g
Sefoksitin	0,016 g

Testin uygulanışı

Hasta seçim kriterlerine uyan hasta örnekleri, +4°C'de en fazla 48 saat bekletilerek işleme alınmıştır. CDSA besiyerleri ilk olarak anaerobik koşullar sağlanarak en az 6 saat süre ile indirgenmiştir. Daha sonra örnekler, alkol şok yöntemi ile, dışkı ile bire bir oranda etil alkol ile karıştırılarak, oda ısısında bir saat çalkalandıktan sonra, pastör pipeti ile 100 µl örnek alınarak indüklenmiş CDSA besiyerine ekilmiştir. Ekilen besiyerleri anaerobik kavanozlara konularak anerob ortam sağlandıktan sonra, 36°C'lik etüvde 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmeye alınmıştır. Kırksekiz saat sonrasında üremesi olmayan koloniler 7 güne kadar anaerob ortamda tekrar bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda topaklanmış cam benzeri görünümlü, hafif filamantöz kenarlı sarı renkteki koloniler işleme alınmıştır. Bu kolonilere Gram boyama yapılmış, katalaz enzim varlığı araştırılmıştır. Gram boyamada gram pozitif basil görünümünde olan ve katalaz enzimi negatif bulunan koloniler MALDI TOF MS (Bruker Daltonics Microflex LT System, Becton Dickinson, İtalya S.p.A.) cihazı kullanılarak isimlendirilmiştir.

3.5. GDH Antijen Spesifik Enzim İmmun Assay (GDH-EIA) ile GDH Antijeni ve Toksin A/B Saptanması

GDH-EIA [C. Diff Quik Chek Complete (CdQCC), Techlab, Blacksburg, VA, USA] testi ile, *C. difficile*'de bulunan GDH enzimi ve toksin B araştırılmıştır.

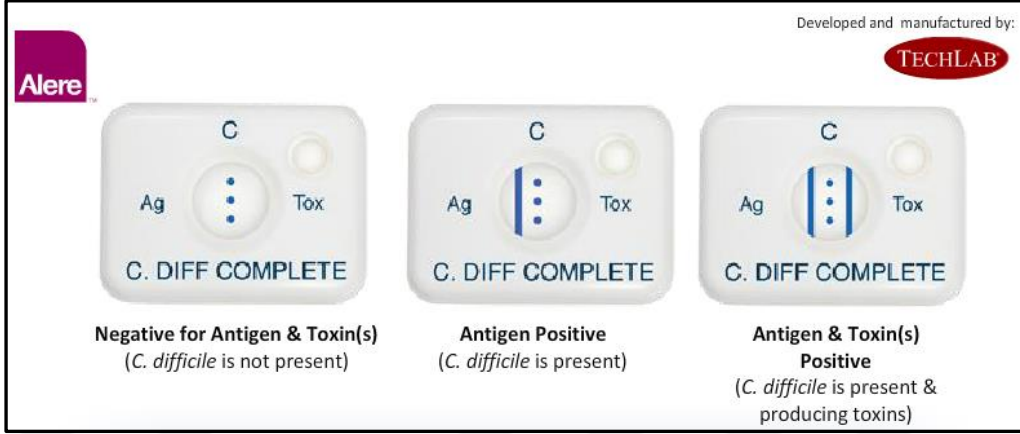
Test kitinin içeriği şöyledir:

1. Membran cihazları; her bir örnek için 1 cihaz bulunur,
2. Dilüent; (her şişede 22 ml) uygun damlalıklı tamponlanmış protein solüsyonu,
3. Yıkama solüsyonu; (her şişede 12 ml) uygun damlalıklı tamponlanmış solüsyon,
4. Substrat; (her şişede 3.5 ml) tetrametilbenzidin içeren solüsyon,
5. Konjugat; (her şişede 2.5 ml) tamponlanmış protein solüsyonunda glutamat dehidrogenaz enzimine spesifik fare monoklonal antikoru ve toksin A ve B'ye spesifik keçi poliklonal antikoları içerir,
6. Pozitif kontrol; (2 ml) tamponlanmış protein solüsyonunda antijen,
7. Plastik transfer pipetleri; 25 µL, 400 µL, 500 µL'lik pipetler.

Testin uygulanışı

GDH enzimini ve Toksin A ve B ye spesifik antikoları kullanarak uygulanan bir testtir. Bu test için kullanılan örnekler en fazla 24 saat +4°C'de bekletilmiştir. Kullanmadan önce kitteki tüm reagenler oda ısısına getirilmiştir. Her bir örnek için bir membran cihazı kullanılır. İlk olarak örnek hazırlığı yapılmıştır. Her bir tüpe 750 µL Dilüent, bir damla konjugat ve 25 µL örnek konulmuştur. İyice karıştırıldıktan sonra, bu karışımdan 500 µL alınarak membran cihazındaki sample well'e konulmuştur. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildikten sonra 300 µL Wash Buffer Reaksiyon penceresine konulmuştur. Üzerine de iki damla substrat damlatılarak 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Reaksiyon penceresinde GDH enzimi ve toksin değerlendirilmesi ayrı ayrı yapılabilmesinden dolayı örnekler ona göre sonuçlandırılmıştır. GDH enzimi pozitif örneklerde reaksiyon penceresinde solda mavi çizgi ve ortada mavi noktalar şeklinde görülmüştür. Toksin pozitifliğinde sağda mavi çizgi ve ortada mavi noktalar şeklinde görülmüştür. Negatif sonuçta ise her iki çizgi de bulunmamakta sadece ortadaki mavi noktalar bulunmaktadır. Ortada mavi

noktaların olmadığı test membranları geçersiz sayılmıştır. Geçersiz sayılan testler tekrarlanmıştır.



Resim 3.1. EIA testinin sonuçlarına örnek.

3.6. PZR

PZR Kiti (The BD MAX™ Cdiff) içindekiler;

1. BD MAX™ Cdiff Master Mix (24 test): tcdB'ye spesifik moleküler prob ve primerlerle birlikte örnek işleme kontrolüne spesifik moleküler prob içeren kurutulmuş PCR Master Mix,
2. BD MAX Cdiff Stripleri (24 test): Örnek işleme ve DNA ekstraksiyonu için gerekli tüm sıvı reaktifler ve tek kullanımlık pipet uçlarını içeren reaktif stripleri,
3. BD MAX Cdiff Ekstraksiyon Tüpü (24 test): Dondurularak kurutulmuş DNA manyetik afinite boncukları, dondurularak kurutulmuş Akromopeptidaz, dondurularak kurutulmuş örnek işleme kontrolü,
4. BD MAX Cdiff Örnek Tamponu Tüpü (24 test),
5. Septum Kapağı (25 adet).

Diğer gerekli ekipmanlar:

1. BD MAX PCR kartuşları,
2. Çoklu tüp vorteksleyici.

Testin uygulanışı

PZR (BD Max Cdiff, Becton Dickinson Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA), *C. difficile* toksin B geninin (tcdB) direk ve kalitatif olarak saptanması için otomatik bir in vitro diagnostik testtir. Örnekler +4°C'de en fazla 5 gün, oda sıcaklığında ise en fazla 5 saat bekletilerek PZR için çalışmaya alınmıştır. Uygun örnekler, yüksek hızda 15 saniye boyunca vortekslelendikten sonra 10 µL'lik inokülasyon özesiyle alınarak örnek tampon tüpüne konulmuştur. Tüm örnekler bu şekilde hazırlanarak çoklu tüp vorteksleyici ile 1 dakika boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir. Her bir örnek için bir BD MAX diff Reaktif Stripi raklara yerleştirilmiştir. Yine her bir örnek için birer C.diff ekstraksiyon tüpü ve C Master Mix tüpü stripteki uygun yerlerine yerleştirilerek kullanılmıştır. PZR kartuşları uygun yerlerine yerleştirilmiştir. Örnekler bilgisayara kaydedilip, raklar BD MAX sistemine yüklendikten sonra PZR ile çalışılmıştır. Cihazın otomatik olarak yaptığı 50-90 dakika arasında değişen ekstraksiyon ve bunu izleyen 30 dakikalık PZR işleminden sonra sonuçlar alınmıştır. Pozitif sonuç veren örnekler tcdB geni için pozitif olarak alınmıştır.

3.7. L-Prolin Aminopeptidaz Enzimini Saptayan PRO Kit (REMEL)

Kitin içinde bulunanlar:

1. Diskler (25 adet): L-Prolin-β-naftilamid içerirler.
2. Reajen (5 ml): p-dimetilaminosinnamaldehyd içerir.

Testin uygulanışı

CDSA besiyerinde üreyen *C. difficile* şüphesi olan koloniler, L-Prolin Aminopeptidaz enzimi PRO Kit (remel) ile araştırılmıştır. Kitte bulunan PRO diskler, L-Prolin-β-naftilamid substratı içermektedir. Bu substrat, aminopeptidaz enzimi ile hidroliz edilerek β-naftilamin salınımına neden olur. Cinnamaldehyd reajeni eklendikten sonra, β-naftilamin- p-dimetil amino cinnamaldehyd ile reaksiyona girerek kırmızı renk verir. *C. difficile* kolonilerinde L-Prolin Aminopeptidaz enzimini bulunduğundan dolayı bu test pozitifdir. Test prosedürüne uygun olarak, kitte bulunan prodisklerden biri alınarak temiz bir lam üzerine konulup, distile su ile disk ıslatıldı. Kültürde üreyen *C. difficile* şüpheli kolonilerden steril çubuklarla alınarak diske

sürülerek, oda ısısında 2-5 dakika bekletildi. Üzerine bir damla cinnamaldehyd reajeninden damlatıldı. Bir dakika içinde pembe-kırmızı renk değişimi olursa pozitif; olmamışsa, renksizse negatif kabul edilmiştir.



Resim 3.2. Prodisk testi pozitif.

Bu test *C. difficile* dışında bazı anaerob bakterilerde (*Capnocytophaga* sp., *Clostridium bifermentas*, *Clostridium sordelii*, *Clostridium sporogenes* gibi) pozitif saptanabilmektedir.

3.8. *C.perfringens* Enterotoksin Testi (TechLab, Inc., Blacksburg, VA)

Kitin içinde bulunanlar:

1. Diluent (40 mL) (tamponlanmış protein solüsyonu + %0.02 thimerosal)
Diluent negative control solüsyonu olarak da kullanılabilir.
2. Konjugate (7 mL) (horseradish peroxidase ile eşleşmiş enterotoksine spesifik poliklonal antikor – tamponlanmış protein solüsyonunda + %0.02 thimerosal).
3. Substrate (14 mL) (tetrametilbenzidine and peroxide içeren tamponlanmış protein solüsyonu).
8. Positive Kontrol Reajeni, (3.5 mL) (%0.02 thimerosal içeren tamponlanmış protein solüsyonunda enterotoksin).
9. Wash Buffer Konsantresi, (50 mL) (tuz, deterjan ve %0.2 thimerosalle tamponlanmış fosfat içeren 20X konsantre).
10. Stop Solusyon, (7 mL) (0.6 N sülfürik asit).

11. 12 Assay Well Strips, 8 kuyucuğun her biri enterotoksin için poliklonal antikorla kaplanmıştır (kurutucuyla depolanarak).
12. 100 adet tek kullanımlık plastik pipet
13. 2 adet plastik yapışkan tabaka
14. 50 adet aplikatör çubuk

Testin uygulanışı

Bu test *C.perfringens* tarafından üretilen enterotoksini saptamak için kullanılan hızlı bir ELISA testidir. Her bir örnek için bir tüp alınarak içine 200 µL dilüent, sulu dışkılar için 50 µL, katı dışkılar içinse 3 mm. çapında örnek konulmuştur. Hazırlanan bu tüpler 10 saniye vortekslenmiştir. İlk olarak stripteki *C.perfringens*'e spesifik antikorla kaplı kuyucuklara, 50 µL konjugat konulmuştur; üzerine 100 µL hazırlanan dilüent-örnek karışımından konulmuştur. Üzeri plastik levha ile kapatılarak 37°C'de iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile partikül kalmayacak biçimde 4-5 kez yıkanır. Ardından su kalmayacak şekilde kağıt havlu üzerine vurularak kurutulmuştur. Üzerine 2 damla (100 µL) substrat eklenerek oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından 1 damla (50 µL) stop solüsyon eklenip 2 dakika bekletilmiştir. Stop solüsyon eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm EIA okuyucusunda okutulularak değerlendirilmiştir. Optik Dansitesi (OD) 0.12'den küçük olanlar negatif, büyük olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.9. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

1. Anaerobik kavanoz
2. Anoxomat cihazı
3. 37° etüv
4. Spor
5. Kriyojenik tüp
6. Vorteks
7. Tek kullanımlık inokülasyon özeleri (10 µL)
8. Otoklav
9. Buzdolabı
10. -70°C derin dondurucu

- 11.** %95'lik etanol
- 12.** Falkon tüpü
- 13.** Distile su
- 14.** Plastik ependorf tüp
- 15.** Nonsteril eldiven
- 16.** Pudrasız tek kullanımlık eldivenler
- 17.** 450/620 nm dalga boyunu ölçen EIA okuyucu
- 18.** GasPak sistemi



4. BULGULAR

Haziran 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı EIA Birimine *Clostridium difficile* Toksin A/B isteği ile gönderilen 2 yaş ve üzeri 200 hastanın dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. 200 hastanın 100'ü (%50) kadın, 100'ü (%50) erkektir. Dışkı örnekleri incelenen, 200 hastanın yaş aralığı (3-68)'dir. Toplam 200 hastanın yaş ortalaması (36.42 ± 21.07) bulunmuştur. Pediatrik hastaların (n=54) %27'si yaş aralığı (3-12) ve yaş ortalamaları ($5,85 \pm 2,74$)'dır. Erişkin hastaların (n=146) %73'ü yaş aralığı (19-68), yaş ortalamaları ise (48.01 ± 10.88)'dir.

Pediatrik hastaların bölümlere göre dağılımı 14'ü (%25.9) pediatrik gastroenteroloji, 11'i (%20.3) pediatrik hematoloji-onkoloji, 21'i (%38.9) genel pediatri kliniği, 8'i (%15.7) kök hücre transplantasyonu, 2'si (%3.7) pediatrik nefroloji, 1'i (%1.85) pediatrik endokrinoloji, 1'i (%1.85) pediatrik nöroloji idi. Toksik kültür pozitif (n=6) pediatrik hastanın bölümlere göre dağılımı; 3'ü (%50) pediatrik gastroenteroloji kliniği, 1'i (%17) pediatrik hematoloji onkoloji kliniği, 1'i (%17) pediatrik kök hücre transplantasyonu, 1'i (%17) genel pediatri bölümü idi. Yaş ortalamaları 4.5, yaş aralığı ise (3-8) idi.

Erişkin hastaların bölümlere göre dağılımı; 41'i (%28) gastroenteroloji, 34'ü (%23) onkoloji, 17'si (%11.64) hematoloji, 16'sı (%10.95) transplantasyon, 11'i (%7.53) enfeksiyon hastalıkları, 9'u (%6.16) dahiliye, 5'i (%3.42) nefroloji, 3'ü (%2.05) göğüs cerrahisi, 2'si (%1.36) yoğun bakım, 3'ü (%2.05) romatoloji, 2'si (%1.36) kardiyoloji, 1'i (%0.68) nöroloji, 1'i (%0.68) genel cerrahi, 1'i (%0.68) ortopedi idi. Toksik kültürü pozitif 7 erişkin hastanın bölümlere göre dağılımı; 4'ü (%57) gastroenteroloji kliniği, 3'ü (%43) onkoloji kliniği idi. Yaş ortalamaları 48; yaş aralığı ise (33-62) idi. Toksik kültür pozitif olan erişkin ve pediatrik (n=13) hastaların demografik özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Toksikjenik kültürü pozitif bulunan hastaların demografik özellikleri.

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Bölüm	Altta Yatan Hastalık
1.	33	K	Gastroenteroloji	Gastrit, osteoporoz
2.	53	K	Onkoloji	Serviks kanseri
3.	34	E	Onkoloji	Onkoloji
4.	62	K	Gastroenteroloji	Crohn
5.	59	K	Onkoloji	Metastatik kanser
6.	33	K	Gastroenteroloji	Gastrit
7.	62	K	Gastroenteroloji	Kolon kanseri
8.	6	K	Pediyatrik gastroenteroloji	VSD, Crohn
9.	4	K	Pediyatri	Yok
10.	3	E	Pediyatrik kök hücre transplantasyonu	SCID, KİT
11.	3	K	Pediyatrik gastroenteroloji	Üriner sistem anomalisi
12.	8	K	Pediyatrik gastroenteroloji	Teratom
13.	3	E	Pediyatrik hematoloji, Onkoloji	Burkitt lenfoma

200 örneğin 26'sında (%13) kültürde *Clostridium* türleri üretildi, MALDI TOF MS ile 17'si (%8.5) *C. difficile*, 3'ü *C. innocuum*, 2'si *C. bartlettii*, 2'si *C. perfringens*, 1'i *C. ramosum*, 1'i *C. spiroforme* olarak isimlendirildi. Üretilen *Clostridium* türlerinin çalışmamızda kullanılan testlere göre elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Kültürde *C. difficile* üreyen 17 (%8.5) örneğin 13'ünde (%6.5) toksijenik kültür pozitif olarak değerlendirildi. Hasta popülasyonumuzda CDE sıklığının %6.5 olduğu belirlendi.

EIA GDH testi ile kültürde *C. difficile* üreyen 17 izolatın 14'ü (%7) pozitif, 3'ü negatif bulundu. Kültürde üremesi olmayan 3 izolatın ve *C. ramosum* üreyen bir izolatın EIA GDH testi pozitif saptandı. Bu yalancı pozitif sonuç olarak değerlendirildi. EIA GDH testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %82.4, %97.8, %77.8 ve %98.4 olarak bulunmuştur.

Toksijenik kültür pozitif olan 13 izolatın 11'inde EIA toksin testi pozitif, 2'si negatif bulundu. EIA toksin testi ile yalancı pozitif sonuç saptanmadı. EIA toksin testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %84.6, %100, %100 ve %98.9 olarak belirlenmiştir.

Toksijenik kültür pozitif olan 13 izolatın 12'sinde PZR testi pozitif, 1 izolatta ise negatif bulundu. PZR testi ile yalancı pozitif sonuç saptanmadı. PZR testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %92.3, %100, %100 ve %99.5 olarak belirlenmiştir.

Kültürde üreyen 17 *C. difficile* izolatının 15'inde prodisk ile pozitif sonuç elde edildi. Toksik kültürü pozitif olan izolatların ikisinde prodisk sonucu negatif bulundu. Bununla birlikte kültürde üreyen 2 *C. bartlettii* izolatında da prodisk ile pozitif sonuç elde edildi ve yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi. Prodisk testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %88.2, %77.8, %88.2 ve %77.8 olarak saptanmıştır.

Kültürde üretilen iki *C. Perfringens* izolatlarından birinde, EIA *C. perfringens* enterotoksin testi pozitif, diğer testler negatif saptandı. Bir *C. perfringens* izolatında ise EIA *C. perfringens* enterotoksin testi ve diğer tüm testler negatif saptandı. Ayrıca kültürde üretilen bir *C. difficile* kökeni, EIA *C. perfringens* testi ile pozitif bulundu. Çalışmamızda EIA *C. perfringens* enterotoksin testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla %50, %99.4, %50, %99.4 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. Kùltürde üretilen *Clostridium* türlerinin test sonuçları.

Hasta No:	Kùltür-MALDI TOF MS	EIA GDH	EIA Toksin A/B	EIA <i>C. Perfringens</i> Enterotoksin Test	PZR	Prodisk	Toksijenik Kùltür
1	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
2	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
3	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
4	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
5	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
6	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
7	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
8	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
9	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
10	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
11	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
12	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
13	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
14	<i>C. difficile</i>	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
15	<i>C. ramosum</i>	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
16	<i>C. difficile</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
17	<i>C. difficile</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
18	<i>C. difficile</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
19	<i>C. perfringens</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
20	<i>C. perfringens</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
21	<i>C. spiroforme</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
22	<i>C. innocuum</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
23	<i>C. innocuum</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
24	<i>C. innocuum</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
25	<i>C. bartlettii</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
26	<i>C. bartlettii</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif

5. TARTIŞMA

Son yıllarda CDE, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada ve çoğu Avrupa ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bakteriler %2-3 oranında sağlıklı kişilerin, %40-60 oranında da özellikle hastanede doğmuş olan yenidoğanların kolon florasında metabolik inaktif spor formunda bulunabilmektedir. İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabilirler. 2000'li yılların başlarında CDE epidemiyolojisi dramatik olarak değişmiş olup, hastalığın sadece insidansı değil, şiddeti de artmıştır. Kanada'da 1991 ile 2003 yılları arasında CDE insidansı her 100.000 kişide 35.6 olgudan 156.3 olguya çıkmıştır. Kasım 2004 ile Nisan 2005 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışmada insidansın her 1000 hastada 4.6 olgu olduğu bildirilmiştir (66). 2008 yılında 34 Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan bir çalışmada CDE insidansının ortalama her 10.000 hasta gününde 4.1 olgu olduğu bildirilmiştir (138). Ylisiurua ve ark.'nın 2013'te Finlandiya'da yaptıkları çalışmada 884 dışkı örneğinin 253'ünde (%29) kültürde pozitiflik saptanmıştır (139). 2014 yılında Balihar ve arkadaşlarının Çek Cumhuriyetinde yaptıkları çalışmada CDE insidansı her 100 hastada 0.1 olarak bulunmuştur (140). 2014 yılında Mittal ve ark.'nın ABD'de yaptığı çalışmada ise insidans %12.4 olarak bulunmuştur (141).

Ülkemizde Aygün ve ark.'nın 2005 yılında prospektif olarak yaptıkları çalışmada saptanan nozokomiyal ishal olgularında EIA testiyle toksin A/B araştırılmış ve %5,5 oranında pozitiflik saptanmıştır (11). 2009 yılında Ergen ve ark.'nın yaptıkları çalışmada EIA ve PZR yöntemi kullanılmış ve pozitiflik oranı %0,5 olarak tespit edilmiştir (142). Deniz ve ark.'nın 2011 yılında yayınlanan çalışmalarında EIA ve PZR yöntemiyle 633 dışkı örneğinden 50'sinde (%7.8) *C. difficile* saptanmıştır (143). 2010 yılında Akgül ve ark.'nın yaptığı çalışmada 100 hastadan 17'sinde pozitiflik saptanmıştır (144). Yılmaz ve ark.'nın yaptığı çalışmada 2001-2006 yılları arasında antibiyotik ilişkili kanlı ishali olan 21 hasta izlenmiş, EIA testi ile 6 (%29) hastada *C. difficile* toksin A/B saptanmıştır (145). Lale ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı çalışmada ise 592 dışkı örneğinin 142'sinde (%24) EIA testi *C. difficile* toksin A/B pozitif olarak saptanmıştır (146).

Bu sonuçları değerlendirdiğimizde, ülkemizde yapılan çalışmalarda CDE sıklık oranı %0.5-24 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda CDE sıklığı bu oranlar arasında olup %6.5 olarak saptanmıştır. Sıklık oranları arasındaki farklılığın, uygulanan testlerin farklılığına, kullanılan kitlerin farklılığına, örneklerin saklanma ve incelenmesindeki yöntem farklılıklarına, hasta yaş grubunun farklı olmasına, hastanelerin antibiyotik kullanım politikalarının farklılığına, hastaların hastanede yatış süreleri ve altta yatan hastalık varlığına bağlı nedenlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Wroblewska ve ark.'nın yaptıkları çalışmada 1998 ve 2002 yılları arasında hastanede yatan yetişkin hastalardan 4.414 dışkı örneği toplamışlardır. 1308 (%29,3) örnek *C. difficile* kültürü pozitif olarak saptanmıştır. Yatan erişkin hastalar içinde en fazla pozitif üreme görülen servis %11,7 ile hematoloji/onkoloji, %8,3 ile nöroloji, %8 ile nefroloji, %7 ile gastroenteroloji ve %6,2 ile nöroşirurjidir (147).

Ülkemizde Altındış ve ark.'nın çalışmalarında örneklerin çoğu dahiliye hastalarından (%41,7) alınmış, bunu enfeksiyon hastalıkları (%15,3) ve cerrahi/anestezi/yoğun bakım üniteleri hastalarından alınan örnekler (%12) izlemiştir (148). Öztürk ve ark.'nın 1995'te yaptığı çalışmada hematoloji onkoloji hastalarında istatistiksel olarak daha anlamlı Toksin A/B pozitifliği saptandığı belirlenmiştir (149). Son yıllarda pediatri servislerinde de *C. difficile* enfeksiyonu görülme sıklığında artış olduğu bildirilmektedir ve bu hasta grubunun da yakından izlenmesi önerilmektedir (150). Bizim çalışmamızda CDE'nun en sık saptandığı bölümler gastroenteroloji (%25) ve pediatrik gastroenteroloji (%25) bölümleri olup bunları sırasıyla erişkin onkoloji bölümü (%18.75), hematoloji (%6.25), nöroloji (%6.25), pediatrik kök hücre transplantasyonu (%6.25) ve genel pediatri (%6.25) bölümleri izlemektedir.

Selvaraju ve ark.'nın 2011 yılında Amerika'da 200 çocuk hasta örneğiyle yaptıkları çalışmada 48 (%24) örnekte pozitiflik saptanmıştır. Bunların 45'i (%22.5) 2 yaş üzerinde çocuklardır (151). Luna ve ark.'nın Teksas'ta 2011 yılında ortalama yaşları 4 olan 86 çocuk hastada yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer oranlarda, 12 çocukta (%14) pozitiflik saptanmıştır (152). Duleba ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı çalışmada 3 ay-16 yaş arasında CDE tanı 64 çocuk hasta alınmış ve *C. difficile* sıklığı en fazla 1-2 yaş arasında (%3.8) gözlenmiştir (153). Bizim çalışmamızda ise 200 hastanın 55 (%27.5) tanesi 3-18 yaş arasındadır. Bu 55 hastadan 6'sında (%11) toksijenik kültür pozitif saptanmıştır. Bu hastaların 5'inde

(%83) altta yatan hastalık malignitedir. Dolayısıyla, hastanede uzun süre yatmayı gerektiren hastalıkların bulunması nedeniyle pediatri servisinin de *C. difficile* yönünden daha sıkı takip edilmesi gerekmektedir.

2001 yılında Oğuz ve ark.'nın Ankara'da yaptıkları çalışmada 2 ay-13 yaş arası 100 nozokomiyal diyareli çocuk çalışmaya alınmış ve toksijenik kültürde *C. difficile* görülme sıklığı %16 bulunmuştur (154). Bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak 2 yaş altındaki çocuklar da çalışmaya alınmış olup, bizim toksijenik kültür oranımızdan (%11) daha yüksek sonuç bulunmuştur.

2010 yılında Deniz ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise 633 hastanın 20 si pediatrik yaş grubundan olup bunların 13 (%65) tanesinde toksijenik kültürde *C. difficile* pozitifliği saptanmıştır (143).

C. difficile tanısını koymada son yıllarda kullanılan testlerden birisi de GDH enziminin saptanmasıdır. GDH enziminin varlığı EIA testiyle gösterilmektedir. GDH testi, pratik, hızlı, ucuz bir testtir. Toksin üreten ve üretmeyen tüm *C. difficile* suşlarında saptanabildiği için özgüllüğü düşüktür. Ancak tarama testi olarak kullanılabilir. Mutlaka toksin testiyle birlikte kullanılmalıdır. Toksik kültürde pozitif bulduğumuz hastaların hepsinde GDH enzimi pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda EIA GDH testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) sırasıyla; %82.4, %97.8,%77.8 ve %98.4 olarak bulunmuş olup, yapılan araştırmalardaki oranlara benzerdir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Çalışmamızda elde edilen EIA-GDH testinin geçerlilik sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılması.

Araştırma	EIA-GDH testi			
	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Kawada ve ark. (155)	100	93.3	93.8	100
Eastwood ve ark. (156)	87.6	94.3	78	97.1
Wren ve ark. (157)	95.4	95.7	67.5	99.5
Reyes ve ark. (158)	79.5	100	100	94.6
Fenner v e ark. (159)	93.4	96.6	75.9	99.2
Snell ve ark. (160)	93.5	98	91.6	98.5
Çalışmamız	82.4	97.8	77.8	98.4

Bulgularımız CDE tanısında GDH testinin güvenilir bir tarama testi olduğu bilgisini desteklemektedir. GDH testinin pozitif olması halinde sonucun EIA toksin veya moleküler yöntemle doğrulanması gerekmektedir.

C. difficile kökenlerinde toksin varlığının araştırılması amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Yolken ve ark. ilk kez 1981 yılında *C. difficile* toksin varlığını saptama amacı ile EIA toksin testini geliştirmişlerdir (161). Bunu takiben yapılan çalışmalar sonucunda yalnızca toksin A'yı ve toksin A + B'yi beraber saptayan kitler geliştirilmiştir (162).

Ülkemizde toksin A/B'yi saptayan EIA testleriyle çalışmalar yapılmıştır. Ayarç ve ark.'nın çalışmalarında, 2008-2011 yılları arasında ishali olgulardan gönderilen toplam 2515 dışkı örneğinde *C. difficile* toksin varlığı retrospektif olarak incelenmiştir. Toksin A ve B'nin tespiti için EIA yöntemi (TOX A/B QUIK CHEK, Techlab) kullanılmış ve 1829 olgudan 87 olguda (%4.8) pozitiflik saptanmıştır (163).

Tunçcan ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada; 2003-2004 yıllarında hastanede yatan ve antibiyotik kullanımı sonrasında ishal gelişen 149 hastada %22.8 oranında *C. difficile* toksin A/B pozitifliği saptanmıştır (164).

Turan ve ark.'nın yapmış olduğu bir başka çalışmada; 2006-2007 yıllarında 72 CDE şüpheli hasta örneğinden 12'sinde (%16.7) EIA ve toksijenik kültür yöntemleriyle toksin pozitifliği saptanmıştır (165).

Deniz ve ark.'nın Eylül 2006 - Mart 2008 arasında yaptığı çalışmada 633 hastaya ait örnekte EIA (ImmunoCard Toxins A&B EIA; Meridian Diagnostics, Belgium) yöntemiyle toksin A/B araştırılmış, pozitiflik saptanan örneklerle "in-house" PZR testi uygulanmıştır Yaşları (2 -65) arası hastaların 50'sinin örneğinde (%7.9) GDH Ag'ni pozitif saptanmıştır. Elli hastadan 36'sının örneğinde toksin A/B pozitif bulunmuştur. Testin duyarlılığı %85.7, özgüllüğü %100, PPD'si %100, NPD'si ise %99 olarak hesaplanmıştır (143).

Cerrahpaşa Üniversitesi'nde Yılmaz ve ark.'nın yaptığı çalışmada 2001-2006 yıllar arasında antibiyotik ilişkili kanlı ishali 21 hasta izlenmiştir. Gaita örneklerinde kültür yapılarak *C. difficile* varlığı, *C. difficile* toksin A/B ile toksin varlığı araştırılmış, 6 (%29) hastada *C. difficile* toksin A/B saptanmıştır (145).

Lale ve ark.'nın 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında 592 dışkı örneğinin toplam 142'sinde (%24) EIA yöntemiyle *C. difficile* toksin A/B pozitif olarak saptanmıştır (146).

Bizim çalışmamızda ülkemizde yapılan diğer çalışmalara benzer oranlarda, EIA toksin A/B testi ile 200 hastadan 11'inde (%5.5) pozitiflik saptanmıştır. Çalışmamızda EIA toksin A/B testinin duyarlılığı %84.6, özgüllüğü %100, PPD ve NPD sırasıyla %100 ve %98.9 bulunmuştur. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda EIA Toksin A/B testinin duyarlılığı %50-100; özgüllüğü %94.3-100 oranları arasında bulunmuştur (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Çalışmamızda elde edilen EIA toksin A/B testinin geçerlilik sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılması.

Araştırma	EIA-Toksin A/B testi			
	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Deniz ve ark. (143)	85.7	100	100	99
Jamal ve ark. (166)	53.85	100	100	98.51
Hirvonen ve ark. (167)	100	100	100	81.1
Goret ve ark. (168)	50	99.5	88.2	96.7
Johan ve ark. (169)	81.6	100	100	98.3
Vasoo ve ark. (170)	79.2	100	100	93.5
Kim ve ark. (171)	63.6	100	100	96.6
Samra ve ark. (172)	83.5	94.3	98.5	91.7
Çalışmamız	84.6	100	100	98.9

C. difficile toksijenik kültürde toksin pozitifliğinin, doğrudan dışkı örneklerinde saptananlara göre daha fazla olması, dışkı örneğinin nakli sırasında, ısı değişikliği veya fekal proteolitik enzimlerin etkisiyle toksin yapısındaki bozulmadan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. EIA testleri hızlı, ucuz, uygulaması kolay olduğundan dolayı çoğu laboratuvarında kullanılan testlerdir (173). Ancak EIA testlerinin referans testlere göre duyarlılığı düşüktür (101). Bu yüzden tek başına kullanımı önerilmemektedir. Bununla birlikte EIA toksin testleri; anaerob kültür yöntemlerinin zahmetli, zaman alıcı olması ve özel donanım gerektirmesi nedeniyle birçok laboratuvarında tercih edilmektedir.

Son zamanlarda çoğu laboratuvar toksijenik türlerin non-toksijenik türlerden ayırımı için kullanılan iki basamaklı bir algoritmayı kullanmaktadır. İlk basamağında GDH testi olan bu algoritmaya göre ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer test negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise toksin testi yapılarak türün toksijenik olduğu doğrulanması gerekmektedir. Her iki test sonucu pozitif ise ve hastada

semptomlar var ise CDE tanısı konulmaktadır. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise ya hasta toksijenik olmayan bir suşu taşımakta veya toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir (15).

Bizim çalışmamızda kültürde *C. difficile* olarak isimlendirilen 17 izolat vardır. Üç *C. difficile* izolatının GDH enzimi negatif bulunmuştur. Bir tane *C. ramosum* olarak isimlendirilmiş ve GDH enzimi pozitif bulunmuştur. Kültürde üreme saptanmayan üç örnekte GDH enzimi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Toplam olarak 18 örnekte GDH enzimi pozitifliği saptanmıştır.

Referans test olarak kullanılan toksijenik kültür ile 13 örnek pozitifdir. Onüç izolatın hepsinde GDH enzimi pozitif bulunmuşken, bunların onbir tanesinde EIA toksin pozitif saptanmıştır. Toksin B negatif olan izolatlarda PZR testi pozitif bulunmuştur. Bu 2 izolatın EIA toksin B testinin negatifliği yanlış negatiflik olarak kabul edilmiştir. Bu durumun toksin titresinin azlığı nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Son yıllarda tanıda kullanılmaya başlayan bir diğer test de NAA testleridir. Yapılan çalışmalar yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir. Ancak bu testi de sınırlayan bazı durumlar vardır. Moleküler yöntemler ile pozitif sonuçlar elde edildiğinde hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Çünkü pozitif bir test sonucu canlı organizmaların mutlaka bulunduğu anlamına gelmemektedir ve bakterinin toksin üretme yeteneğini saptamaktadır. Hasta asemptomatik taşıyıcı da olabilir. Ancak *tcdB* geninin bulunduğu anlamına gelir ve toksijenik *C. difficile* tanısının varsayılmasını sağlar (174).

Stamper ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sitotoksin ve toksijenik kültür testleri pozitif olan bir hasta örneğinde PZR testi sonucu yalancı negatif olarak saptanmıştır (175). Benzer bir çalışmada Elizabeth ve ark. 4 örnekte GDH antijen ve toksin A ve B EIA testi sonucu pozitif iken PZR sonucunun yalancı negatif olduğunu saptamışlardır (156). Bizim çalışmamızda da, toksijenik kültürde pozitif bulunan bir suşun GDH enzimi ve EIA toksin B testleri pozitif bulunurken, PZR testi negatif bulunmuştur. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalancı negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun *tcdB* geninde gerçekleşen mutasyon ve ya sadece toksin B-/binary toksin+ sentezleyen suş nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Son zamanlarda *tcdB* gen bölgelerinde mutasyonlar ve delesyonlar olan toksijenik suşların varlığı bilinmektedir (176, 177). Toksin A+/binary toksin + ve toksin B - olan yeni

bir suş da izole edilmiştir. Toksin B negatif olan bu suş genetik olarak Kuzey Amerika'da salgına neden olan BI/NAP1/027 ribotipinden farklıdır (178). Çalışmamızda PZR testinin duyarlılığı %92.3, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD %99.5 bulunmuştur. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda PZR testinin duyarlılığı %81.6-99.6; özgüllüğü %89.3-99.4 oranları arasında bulunmuştur (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. PZR (BDMAX) testinin geçerlilik sonuçları.

Araştırma	PZR testi			
	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Hirvonen ve ark. (167)	99.6	98.7	96.3	97.8
Putsathit ve ark. (179)	95.5	99	87.5	99.7
Chiang ve ark. (180)	93.4	97.3	96	94
Dalpke ve ark. (181)	90.5	97.9	89.3	98.1
Leitner ve ark. (182)	96	99.4	96	99.4
Shin ve ark. (183)	86.3	89.3	97	62
Yoo ve ark. (184)	81.6	95.8	91	90
Çalışmamız	92.3	100	100	99.4

AAD'lerde bir başka etken *C.perfringens*'tir. *C.perfringens* normal sağlıklı kişilerin de bağırsak florasında da bulunur. Enterotoksin üreten *C.perfringens* kökenleri hastalığa neden olur. Bu nedenle enterotoksin üreten bu kökenleri saptayan testler geliştirilmiştir. Toksini saptayan EIA testleri ile toksinin salgılanmasını sağlayan cpe genini saptayan PZR testleri kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar vardır. Abrahao ve ark 2001'de AAD'li hastalarda EIA ile *C. perfringens* enterotoksinini araştırmış ve sıklığını %6.4 bulmuşlardır (185). Asha ve ark.'nın 2002 de yaptıkları çalışmada EIA testi ile %8, 2006'daki çalışmalarında ise %3.3 olarak saptamışlardır (63, 186). Forward ve ark. %2.5, Joshy ve ark. %10 bulmuşlardır (187, 188). Heimesaat ve ark.'nın çalışmasında *C.perfringens* enterotoksin sıklığını %0.14 olarak bulmuşlardır (189). Vaishnavi ve ark.'nın 2008'de yaptıkları çalışmada, AAD'li hastalarda *C.perfringens* enterotoksin sıklığını %2 bulmuşlardır (190). Bizim çalışmamızda ise *C.perfringens* EIA toksin testi ile *C.perfringens* sıklığı %1 olarak saptanmıştır. Bu farklı değerlerin nedeni, sıklığının, mevsimsel değişiklikler veya salgın gibi durumlardan etkilenmesi olabilmektedir (191).

Çalışmamızda kültürde *C.perfringens* olarak bulunan iki izolattan birinde enterotoksin pozitif, diğesinde negatif olarak saptanmıştır. Bu negatifliğin nedeni; *C.perfringens* kökeninin toksin üretmemesi olabilir. Ancak bu negatiflik yanlış negatiflik olarak da kabul edilebilir. Eğer dışkı semptomların başlangıcında alındıysa, dışkıdaki toksin miktarı maksimum düzeydedir. Dışkı geç alınmışsa toksin düzeyi azalacağından EIA testi ile sonucumuz negatif çıkmış olabilir. Yanlış negatifliğin bir başka nedeni de dışkının saklanması (dondurma ve çözme) sırasında enterotoksinin etkisinin azalmış olabileceği veya enterotoksin inaktive olmuş olabileceğidir (192).

Çalışmamızda EIA *C.perfringens* enterotoksin testinin duyarlılığı, özgülüğü, PPD ve NPD sırasıyla %50, %99.4, %50, %99.4 olarak bulunmuştur.

Kültürde *C. difficile* üretilen bir hastada, EIA *C. perfringens* enterotoksin testiyle pozitif bulunmuştur. Bu suşun GDH enzimi ve prodisk testi pozitif, EIA toksin A/B ve PZR testi negatif bulunmuştur. EIA *C. perfringens* enterotoksin pozitifliği yanlış pozitiflik olarak kabul edilmiştir. Yanlış pozitifliğin nedeninin *C. difficile* ile çapraz reaksiyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

CDE'nin laboratuvar tanısı, CDE'nin ciddiyetinde ve sıklığındaki artıştan dolayı önemini korumaktadır. CDE tanısı için farklı testler bulunmaktadır. Bu yüzden her mikrobiyoloji laboratuvarında CDE tanısı için kullanılan test farklılık gösterebilmektedir.

EIA GDH testi, pratik, hızlı, ucuz bir tarama testi olarak kullanılabilir. Ancak toksin üreten ve üretmeyen tüm *C. difficile* suşlarında saptanabildiği için özgüllüğü düşüktür, mutlaka toksin testiyle birlikte kullanılmalıdır. Bu nedenle EIA GDH testi bir ön test tarama testidir. Pozitif sonuçların Toksin A/B'yi saptayan EIA testi ve toksin B genini saptayan moleküler test ile doğrulanması gerekmektedir. Ancak toksin A/B EIA ve moleküler testlerle nadir de olsa yalancı negatifliğin söz konusu olabileceği de unutulmamalıdır.

EIA toksin A/B testleri hızlı, ucuz, uygulaması kolay olmasından dolayı çoğu laboratuvarında kullanılan testlerdir. Bu testler toksin A ve B'yi saptayabilir. Ancak *binary* toksini saptayabilen herhangi bir EIA testi henüz geliştirilmemiştir. Ayrıca EIA testlerinin referans testlerden önemli ölçüde düşük duyarlılığı vardır. Bu yüzden tek başına kullanımı önerilmemektedir.

PZR testi, hızlı ve yüksek duyarlılığa sahiptir. EIA testlerine göre daha pahalıdır. Ancak algoritmali testlerin işgücü maliyeti düşünüldüğünde, tek başına PZR testinin fiyatının daha avantajlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak PZR testinin de asemptomatik hastalarda da yanlış pozitifliğe neden olabileceği unutulmamalıdır.

Son zamanlarda *tcdB* gen bölgelerinde mutasyonlar ve delesyonlar olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle PZR testi ile yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir. Sonuç olarak;

1. Laboratuvarlar sadece GDH enzimi saptayan bir test kullanıyorsa, önce tarama testi olarak GDH enzimi bakılması, pozitif çıkanlara PZR testi uygulanması, eğer bu iki test arasında uyumsuzluk varsa toksijenik kültür yapılarak doğrulama yapılmasını,

2. GDH + toksin A/B'yi birlikte saptayan testler kullanılıyorsa, ilk olarak bu testin çalışılması, sonucu uyumsuz çıkanlara PZR yapılması veya toksijenik kültürle doğrulama yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.



7. ÖZET

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Yatan İki Yaş ve Üzeri Hastalarda *Clostridium Difficile* İlişkili İshallerin Toksik Gen Kültür, GDH Enzim, Toksin A/B ve PZR ile Toksin Genlerinin Araştırılması

Bu çalışmada amaç, *C. difficile* nedenli ishal olduğu düşünülen hastaların dışkı örneklerinden EIA yöntemi ile toksin varlığının aranması, aynı örneklerin kültürlerinden ise *C. difficile* kökenlerinin izolasyonunun yapılması ve PZR ile toksin araştırılması yaparak hastanemizde, *C. difficile* nedenli ishal sıklığının araştırılmasıdır.

Çalışma kapsamına, Haziran 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı ELISA Birimi'ne *C. difficile* Toksin A/B isteği ile gönderilen dışkı örneklerinden, iki yaş üzeri 200 hasta alınmıştır.

Dışkı örnekleri CDSA seçici besiyerine ekilip ve anaerob ortamda kültürü yapılmıştır. İzole edilen organizmalar MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Microflex LT System, Becton Dickinson, İtalya S.p.A) ile tanımlanmıştır. *C. difficile* çıkan örnekler ardından ELISA yöntemiyle veya PZR ile toksin varlığına bakılarak toksijenik kültür yapılmıştır. Aynı zamanda bu dışkılarından EIA (*C.diff* Quik Chek Complete (CdQCC), Techlab, Blacksburg, VA, USA) yöntemi ile GDH ve toksin B, PZR (BD Max Cdiff, BD Diagnostics) ile de toksin B geni çalışılmıştır. Toksik gen kültür referans test olarak kabul edilmiştir. Hasta popülasyonumuzda CDE sıklığı %6.5 bulunmuştur. Toksik gen kültürüne göre pozitif bulunan 13 örnekte hepsinde EIA GDH testi pozitif bulunmuştur. Bu 13 örneğin 11'inde EIA toksin testi ile, 12'sinde de PZR testi ile pozitiflik saptanmıştır.

Sonuçlarımıza göre GDH EIA testi, riskli hasta gruplarında tarama testi olarak kullanılabilir. Pozitif sonuçların Toksin A+B'yi saptayan EIA testi ve toksin B genini saptayan moleküler test ile doğrulanması gerekmektedir. Hastanın kliniği ile test sonucu uyumsuz olduğunda toksijenik kültür yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *C. difficile*, PZR, GDH, EIA, Kültür.

8. ABSTRACT

Investigation of Toxigenic *Clostridium Difficile*-Associated Diarrhea by Culture, GDH Enzyme, Toxin A/B and Toxin Gene by PCR at Hospitalized Patients with Two Years and Older in Akdeniz University Medical School Hospital

In this study we aim to explore the existence of toxin by EIA method in patient's stool sample with diarrhea thought to be due to *C. difficile*. In addition isolation of *C. difficile* origins from culture of same samples and toxin exploration performed by PCR to investigate the frequency of *C. difficile* induced diarrhea in our hospital.

This study consist of 200 patients above 2 years old in Akdeniz University hospital Central Laboratory ELISA Unit for exploration of *C. difficile* toxin A/B in stool samples between July 2013-November 2013.

Stool samples are planted in CDSA selective medium and anaerobic culture performed. Isolated microorganisms are defined by MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics Microflex LT System, Becton Dickinson, Italy s.p.a)

Toxigenic culture performed by PCR or ELISA method in *C. difficile* positive samples with existence of toxin. At the same time GDH and Toxin B studied by EIA (*C. diff* Quik Check Complete (CDQCC), Techlab, Blacksburg, va, USA) whereas toxin B gene by PCR (BD max *Cdiff*, BD Diagnostics)

Toxigenic culture is considered as reference test. CDE frequency is found as 6.5% in our patient population. All of 13 samples which are positive for toxigenic culture, are positive for EIA GDH test. Positivity is detected in 11 of 13 samples by EIA toxin test and 12 of 13 samples by PCR test.

According to our results GDH EIA test can be used as screening test in risky patient population. Positive results must be verified by EIA test which detect toxin A+B and molecular test which detect toxin B gene. Toxigenic culture must be performed when incompatible situations occurred between the test result and patient's clinic.

Key words: *C. difficile*, PCR, GDH, EIA, Culture.

9. KAYNAKLAR

1. Söyletir G. Antibiyotiğe bağılı kolitler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2002; 762.
2. Murray PR. Manual of Clinical Microbiology 9ed 2007.
3. Brooks GF. Sporlu Gram pozitif çomaklar. In: Jawetz M, Adelberg, editor. Tıbbi Mikrobiyoloji 24ed 2010; 211.
4. Gerding DN. Global epidemiology of Clostridium difficile infection in 2010. Infection Control and Hospital Epidemiology: the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 2010; 31 Suppl 1: 32-4.
5. Rupnik M. How to detect Clostridium difficile variant strains in a routine laboratory. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2001; 7(8): 417-20.
6. Kıyan M. Anaerob sporlu basiller. In: ŞU, editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 1999; 623.
7. Bilgehan H. Anaerob sporlu basiller. In: Bilgehan H, editor. Klinik Mikrobiyoloji 5ed 2009; 547.
8. Brazier JS. The diagnosis of Clostridium difficile-associated disease. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41 Suppl C: 29-40.
9. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infection Control and Hospital Epidemiology : the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 2010; 31(5): 431-55.
10. Borriello SP, Wilcox MH. Clostridium difficile infections of the gut: the unanswered questions. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41 Suppl C: 67-9.

11. Aygun G, Yilmaz M, Yasar H, Aslan M, Polat E, Midilli K, et al. Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? *The Journal of Hospital Infection* 2005; 60(3): 283-5.
12. Baron S. *Medical Microbiology* 4ed 1996.
13. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 46 Suppl 1: 4-11.
14. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 46 Suppl 1: 12-8.
15. Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. *Anaerobe* 2011; 17(4): 170-4.
16. Dawson LF, Valiente E, Wren BW. *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 2009; 9(6): 1410-7.
17. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(2): 247-63.
18. Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 1984; 149(5): 781-8.
19. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes* 2012; 3(2): 121-34.
20. Stevens V, Dumyati G, Fine LS, Fisher SG, van Wijngaarden E. Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; 53(1): 42-8.

21. Britton RA, Young VB. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends in Microbiology* 2012; 20(7): 313-9.
22. Kelly CP. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012;18 Suppl 6: 21-7.
23. Kelly CP, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60(Pt 8): 1070-9.
24. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 Suppl 1: 4554-61.
25. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; 53(10): 994-1002.
26. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine* 2013; 368(5): 407-15.
27. Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, et al. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics* 2006; 38(7): 779-86.
28. Alonso CD, Treadway SB, Hanna DB, Huff CA, Neofytos D, Carroll KC, et al. Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 54(8): 1053-63.

29. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23(3): 529-49.
30. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. *International J of Antimicrobial Agents* 2009; 33 Suppl 1: 33-6.1
31. Carter GP, Awad MM, Kelly ML, Rood JI, Lyras D. TcdB or not TcdB: a tale of two *Clostridium difficile* toxins. *Future Microbiology* 2011; 6(2): 121-3.
32. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7(7): 526-36.
33. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends in Microbiology* 2012; 20(1): 21-9.
34. Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of Medical Microbiology* 2012; 61(Pt 2): 169-79.
35. Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57(Pt 6): 685-9.
36. Dineen SS, McBride SM, Sonenshein AL. Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY. *Journal of Bacteriology* 2010; 192(20): 5350-62.
37. Jank T, Reinert DJ, Giesemann T, Schulz GE, Aktories K. Change of the donor substrate specificity of *Clostridium difficile* toxin B by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(45): 37833-8.
38. Peniche AG, Savidge TC, Dann SM. Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2013; 26(5): 447-53.
39. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *The American Journal of Gastroenterology* 1997; 92(5): 739-50.

40. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, et al. Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathogens 2009; 5(10): e1000626.
41. Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, et al. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin Clostridium difficile transferase (CDT). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011; 108(39): 16422-7.
42. Borriello SP. Pathogenesis of Clostridium difficile infection. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41 Suppl C: 13-9.
43. Pothoulakis C, LaMont JT. Clostridium difficile colitis and diarrhea. Gastroenterology Clinics of North America 1993; 22(3): 623-37.
44. Pechine S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc MC, Delmee M, et al. Immunological properties of surface proteins of Clostridium difficile. Journal of Medical Microbiology 2005; 54(Pt 2): 193-6.
45. Sarker MR, Paredes-Sabja D. Molecular basis of early stages of Clostridium difficile infection: germination and colonization. Future Microbiology 2012; 7(8): 933-43.
46. Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Dodson P, Hyde S, Bourlioux P, et al. A Clostridium difficile gene encoding flagellin. Microbiology 2000; 146 (Pt 4): 957-66.
47. Badur S. Enfeksiyon patogenezi ve bağışıklık. Cilt 2 (clostridium difficile patogenezi); 1053.
48. Souza MHLP M-FA, Rocha MFG. The involvement of macrophage-derived tumour necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by Clostridium difficile toxin B. Immunology 1997; 281-8.
49. Linevsky JK, Pothoulakis C, Keates S, Warny M, Keates AC, Lamont JT, et al. IL-8 release and neutrophil activation by Clostridium difficile toxin-exposed

- human monocytes. *The American Journal of Physiology* 1997; 273(6 Pt 1): 1333-40.
50. Calderon GM, Torres-Lopez J, Lin TJ, Chavez B, Hernandez M, Munoz O, et al. Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. *Infection and Immunity* 1998; 66(6): 2755-61.
 51. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *The New England Journal of Medicine* 1978; 298(10): 531-4.
 52. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. *The New England Journal of Medicine* 1994; 330(4): 257-62.
 53. Reinke CM, Messick CR. Update on *Clostridium difficile*-induced colitis, Part 1. *American Journal of Hospital Pharmacy* 1994; 51(14): 1771-81.
 54. Bartlett JG. *Clostridium difficile*-associated Enteric Disease. *Current Infectious Disease Reports* 2002; 4(6): 477-83.
 55. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *The Journal of Infection* 2009; 58(6): 403-10.
 56. Vaishnavi C. Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *The Indian Journal of Medical Research* 2010; 131: 487-99.
 57. Lung E. Acute diarrheal diseases. In: Friedman SL MK, Grendell JH, editor. *Current Diagnosis & Treatment in Gastroenterology* 2ed 2003; 131-50.
 58. Wood M. When stool cultures from adult inpatients are appropriate. *Lancet* 2001; 357(9260): 901-2.
 59. Daube G, China B, Simon P, Hvala K, Mainil J. Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. *The Journal of Applied Bacteriology* 1994; 77(6): 650-5.
 60. Issa M, Ananthakrishnan AN, Binion DG. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2008; 14(10): 1432-42.

61. Modi N, Wilcox MH. Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54(10): 748-51.
62. McClane BA. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 2001; 39(11): 1781-91.
63. Asha NJ, Wilcox MH. Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 2002; 51(10): 891-4.
64. Worsley MA. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41 Suppl C: 59-66.
65. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal= Journal de l'Association Medicale Canadienne* 2004; 171(5): 466-72.
66. Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 48(5): 568-76.
67. Barbut F, Delmee M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2003; 9(10): 989-96.
68. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12(3): 409-15.

69. Bartlett JG. Clostridium difficile: progress and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; 1213: 62-9.
70. McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kutty PK, et al. Recommendations for surveillance of Clostridium difficile-associated disease. *Infection Control and Hospital Epidemiology: the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2007; 28(2): 140-5.
71. Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J, et al. The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of Clostridium difficile. *PLoS Pathogens* 2011; 7(10): e1002317.
72. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353(23): 2433-41.
73. Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, et al. Clinical features of Clostridium difficile-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *Journal of Medical Microbiology* 2005; 54(Pt 2): 181-5.
74. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent Clostridium difficile BI/NAP1/027. *PloS One* 2011; 6(9): e24894.
75. Murray PR. Antibiotic Associated Colitis. In: Thielman N.M. WKH, editor. *Medical Microbiology 7ed* 2009; 1375-87.
76. Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, Doherty JA, Kollef MH. Clostridium difficile-associated disease and mortality among the elderly critically ill. *Critical Care Medicine* 2009; 37(9): 2583-9.
77. Welfare MR, Lalayiannis LC, Martin KE, Corbett S, Marshall B, Sarma JB. Co-morbidities as predictors of mortality in Clostridium difficile infection and derivation of the ARC predictive score. *The Journal of Hospital Infection* 2011; 79(4): 359-63.

78. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology* 2013; 108(4): 478-98; quiz 99.
79. Lin HJ, Hung YP, Liu HC, Lee JC, Lee CI, Wu YH, et al. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea among hospitalized adults with fecal toxigenic *C. difficile* colonization. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 2015; 48(2): 183-9.
80. Banaszkiwicz A, Pituch H. *Clostridium difficile* infection in children with inflammatory Bowel Disease: Current Evidence. *Current Pharmaceutical Design* 2013.
81. Khanna R, Chande N, Nelson RL. Treatment of an initial infection with *clostridium difficile* in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2013; 19(10): 2223-6.
82. Berg AM, Kelly CP, Farraye FA. *Clostridium difficile* infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflammatory Bowel Diseases* 2013; 19(1): 194-204.
83. Deshpande A, Pant C, Pasupuleti V, Rolston DD, Jain A, Deshpande N, et al. Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection in a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 2012; 10(3): 225-33.
84. Vestreinsdottir I, Gudlaugsdottir S, Einarsdottir R, Kalaitzakis E, Sigurdardottir O, Bjornsson ES. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2012; 31(10): 2601-10.
85. Bavishi C, Dupont HL. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2011; 34(11-12): 1269-81.

86. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. Clostridium difficile-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 2012; 107(7): 1001-10.
87. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. Risk of Clostridium difficile infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 2012; 107(7): 1011-9.
88. Barletta JF, El-Ibiary SY, Davis LE, Nguyen B, Raney CR. Proton Pump Inhibitors and the Risk for Hospital-Acquired Clostridium difficile Infection. *Mayo Clinic Proceedings Mayo Clinic* 2013; 88(10): 1085-90.
89. Freedberg DE, Salmasian H, Friedman C, Abrams JA. Proton Pump Inhibitors and Risk for Recurrent Clostridium difficile Infection Among Inpatients. *The American Journal of Gastroenterology* 2013.
90. Howland RH. Antidepressant drugs and infectious disease. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services* 2013; 51(7): 11-4.
91. Mikocka-Walus A. Depression and use of antidepressants is associated with increased risk of Clostridium difficile infection. *Evidence-Based Mental Health* 2013; 16(4): 95.
92. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J, Jr. Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. *Infection Control and Hospital Epidemiology: the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 1995; 16(8): 459-77.
93. Delmee M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001; 7(8): 411-6.
94. Bartlett JG. Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. *Infectious Diseases 2ed* 2004; 670-7.
95. Stanley JD, Bartlett JG, Dart BWt, Ashcraft JH. Clostridium difficile infection. *Current Problems in Surgery* 2013; 50(7): 302-37.

96. Dupont HL. Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 2013; 11(10): 1216-23; quiz e73.
97. Brazier JS. *Clostridium difficile*: the anaerobe that made the grade. *Anaerobe* 2012; 18(2): 197-9.
98. Vaishnavi C. Diagnostic approach to *Clostridium difficile* infection. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology* 2010; 29(4): 137-9.
99. Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(3): 604-30.
100. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. *Journal of the American Geriatrics Society* 2010; 58(8): 1556-64.
101. Marra F, Ng K. Controversies Around Epidemiology, Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Drugs* 2015; 75(10): 1095-118.
102. Badger VO, Ledebor NA, Graham MB, Edmiston CE, Jr. *Clostridium difficile*: epidemiology, pathogenesis, management, and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2012; 36(6): 645-62.
103. Kundrapu S, Sunkesula VC, Jury LA, Sethi AK, Donskey CJ. Utility of perirectal swab specimens for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 55(11): 1527-30.
104. Available from: www.cdc.gov/media/releases/2013/p1212-mrsa-cdifficile.html
105. Eckert C, Burghoffer B, Lalande V, Barbut F. Evaluation of the chromogenic agar chromID *C. difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1002-4.

106. Garimella PS, Agarwal R, Katz A. The utility of repeat enzyme immunoassay testing for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review of the literature. *Journal of Postgraduate Medicine* 2012; 58(3): 194-8.
107. Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual Review of Microbiology* 2011; 65: 501-21.
108. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *clostridium difficile* disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(6): 2082-6.
109. Reller ME, Alcabasa RC, Lema CA, Carroll KC. Comparison of two rapid assays for *Clostridium difficile* Common antigen and a C difficile toxin A/B assay with the cell culture neutralization assay. *American Journal of Clinical Pathology* 2010; 133(1): 107-9.
110. Wren B, Clayton C, Tabaqchali S. Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. *Lancet* 1990; 335(8686): 423.
111. Kato N, Ou CY, Kato H, Bartley SL, Brown VK, Dowell VR, Jr., et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(1): 33-7.
112. Barkin JA, Nandi N, Miller N, Grace A, Barkin JS, Sussman DA. Superiority of the DNA amplification assay for the diagnosis of *C. difficile* infection: a clinical comparison of fecal tests. *Digestive Diseases and Sciences* 2012; 57(10): 2592-9.
113. Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea. *Gut* 2004; 53(1): 58-61.
114. Ashraf H, Beltinger J, Alam NH, Bardhan PK, Faruque AS, Akter J, et al. Evaluation of faecal occult blood test and lactoferrin latex agglutination test in screening hospitalized patients for diagnosing inflammatory and non-

- inflammatory diarrhoea in Dhaka, Bangladesh. *Digestion* 2007; 76(3-4): 256-61.
115. van Langenberg DR, Geary RB, Wong HL, Ward M, Gibson PR. The potential value of faecal lactoferrin as a screening test in hospitalized patients with diarrhoea. *Internal Medicine Journal* 2010; 40(12): 819-27.
116. Miller JR, Barrett LJ, Kotloff K, Guerrant RL. A rapid test for infectious and inflammatory enteritis. *Archives of Internal Medicine* 1994; 154(23): 2660-4.
117. Sherwood RA. Faecal markers of gastrointestinal inflammation. *Journal of Clinical Pathology* 2012; 65(11): 981-5.
118. Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(11): 3137-41.
119. Fedorko DP, Williams EC. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(5): 1258-9.
120. Artsimovitch I, Seddon J, Sears P. Fidaxomicin is an inhibitor of the initiation of bacterial RNA synthesis. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 55 Suppl 2: 127-31.
121. Louie TJ, Cannon K, Byrne B, Emery J, Ward L, Eyben M, et al. Fidaxomicin preserves the intestinal microbiome during and after treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI) and reduces both toxin reexpression and recurrence of CDI. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 55 Suppl 2: 132-42.
122. Kelly CP. Current strategies for management of initial *Clostridium difficile* infection. *Journal of hospital medicine : an official publication of the Society of Hospital Medicine* 2012; 7 Suppl 3: 5-10.
123. O'Keefe SJ. Tube feeding, the microbiota, and *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2010; 16(2): 139-42.

124. Lamontagne F, Labbe AC, Haeck O, Lesur O, Lalancette M, Patino C, et al. Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant *Clostridium difficile* colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain. *Annals of Surgery* 2007; 245(2): 267-72.
125. Perera AD, Akbari RP, Cowher MS, Read TE, McCormick JT, Medich DS, et al. Colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis: predictors of mortality. *The American Surgeon* 2010; 76(4): 418-21.
126. Markelov A, Livert D, Kohli H. Predictors of fatal outcome after colectomy for fulminant *Clostridium difficile* Colitis: a 10-year experience. dr.markelov@gmail.com. *The American Surgeon* 2011; 77(8): 977-80.
127. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA, et al. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hatology: the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 2011; 9(12): 1044-9.
128. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *The American Journal of Gastroenterology* 2012; 107(7): 1079-87.
129. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2010; 16(18): 2202-22.
130. Drago L, Rodighiero V, Celeste T, Rovetto L, De Vecchi E. Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009. *Journal of Cmotherapy* 2010; 22(6): 373-7.
131. Abougergi MS, Kwon JH. Intravenous immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review. *Digestive Diseases and Sciences* 2011; 56(1): 19-26.
132. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362(3): 197-205.

133. Giannasca PJ, Warny M. Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Vaccine* 2004; 22(7): 848-56.
134. Lee BY, Popovich MJ, Tian Y, Bailey RR, Ufberg PJ, Wiringa AE, et al. The potential value of *Clostridium difficile* vaccine: an economic computer simulation model. *Vaccine* 2010; 28(32): 5245-53.
135. Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, Keates S, Maroo S, Pothoulakis C, et al. *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 2005; 128(3): 764-70.
136. Tran MC, Claros MC, Goldstein EJ. Therapy of *Clostridium difficile* infection: perspectives on a changing paradigm. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2013; 14(17): 2375-86.
137. Carrico RM. Guide to preventing *Clostridium Difficile* infections. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology* 2013; 32-81.
138. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011; 377(9759): 63-73.
139. Ylisiurua P, Koskela M, Vainio O, Tuokko H. Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2013; 45(1): 19-25.
140. Balihar K, Kozak F, Kozeluhova J, Hejda V, Fremundova L, Krcma M, et al. *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients at a Czech tertiary center: analysis of epidemiology, clinical features, and risk factors of fulminant course. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2014; 26(8): 880-7.
141. Mittal C, Hassan S, Arshad S, Jeepalyam S, Bruni S, Miceli M, et al. *Clostridium difficile* infection in liver transplant recipients: a retrospective study of rates, risk factors and outcomes. *American Journal of Transplantation* : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2014; 14(8): 1901-7.

142. Ergen EK, Akalin H, Yilmaz E, Sinirtas M, Alver O, Heper Y, et al. Nosocomial diarrhea and Clostridium Difficile associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Medecine et Maladies Infectieuses* 2009; 39(6): 382-7.
143. Deniz U, Ulger N, Aksu B, Karavus M, Soyletir G. [Investigation of toxin genes of Clostridium difficile strains isolated from hospitalized patients with diarrhoea at Marmara University Hospital]. *Mikrobiyoloji Bulteni* 2011; 45(1): 1-10.
144. Akgül Ö. Nazokomiyal İshallerde Clostridium Difficile Sıklığının Araştırılması 2010.
145. Yilmaz M, Bilir YA, Aygun G, Erzin Y, Ozturk R, Celik AF. Prospective observational study on antibiotic-associated bloody diarrhea: report of 21 cases with a long-term follow-up from Turkey. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2012; 24(6): 688-94.
146. Lale Z, Fidan I, Adıyaman G, Yeşilyurt E, Özkan S, Çağlar K. İshalli Hastaların Dışkı Örneklerinde *C. Difficile* Toksin A/B Sıklığının Araştırılması. *ANKEM Dergisi* 2013; 27: 55-9.
147. Wroblewska MM, Swoboda-Kopec E, Rokosz A, Nurzynska G, Bednarska A, Luczak M. Detection of Clostridium difficile and its toxin A (TcdA) in stool specimens from hospitalised patients. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists* 2005; 54(2): 111-5.
148. Altindis M, Usluer S, Ciftci H, Tunc N, Cetinkaya Z, Aktepe OC. [Investigation of the presence of Clostridium difficile in antibiotic associated diarrhea patients by culture and toxin detection methods]. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2007; 41(1): 29-37.
149. Öztürk R MK, Ergin S. İshalli olgularda ELISA yöntemi ile Clostridium difficile Toksin A aranması,. 5 Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı, İstanbul 1995; 11: 101.
150. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of Clostridium difficile-associated disease among

- inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *Pediatrics* 2008; 122(6): 1266-70.
151. Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, Nguyen A, Jackson MA, Selvarangan R. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pediatric stool samples: an evaluation of Quik Check Complete Antigen assay, BD GeneOhm Cdiff PCR, and ProGastro Cd PCR assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 71(3): 224-9.
 152. Luna RA, Boyanton BL, Jr., Mehta S, Courtney EM, Webb CR, Revell PA, et al. Rapid stool-based diagnosis of *Clostridium difficile* infection by real-time PCR in a children's hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(3): 851-7.
 153. Duleba K, Pawlowska M, Wietlicka-Piszc M. *Clostridium difficile* infection in children hospitalized due to diarrhea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2014; 33(2): 201-9.
 154. Oguz F, Uysal G, Dasdemir S, Oskovi H, Vidinlisan S. The role of *Clostridium difficile* in childhood nosocomial diarrhea. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001; 33(10): 731-3.
 155. Kawada M, Annaka M, Kato H, Shibasaki S, Hikosaka K, Mizuno H, et al. Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2011; 17(6): 807-11.
 156. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(10): 3211-7.
 157. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NR. Laboratory diagnosis of *clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate

- dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. *British Journal of Biomedical Science* 2009; 66(1): 1-5.
158. Reyes RC, John MA, Ayotte DL, Covacich A, Milburn S, Hussain Z. Performance of TechLab C. Diff Quik Chek and TechLab C. Difficile Tox A/B II for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 59(1): 33-7.
159. Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(1): 328-30.
160. Snell H, Ramos M, Longo S, John M, Hussain Z. Performance of the TechLab C. Diff Chek-60 enzyme immunoassay (EIA) in combination with the C. difficile Tox A/B II EIA kit, the Triage C. difficile panel immunoassay, and a cytotoxin assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4863-5.
161. Bouza E, Pelaez T, Alonso R, Catalan P, Munoz P, Creixems MR. "Second-look" cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. *The Journal of Hospital Infection* 2001; 48(3): 233-7.
162. Yucesoy M, McCoubrey J, Brown R, Poxton IR. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; 8(7): 413-8.
163. Oğuz Ayarçı A, Oral B, İlbaşı AR, Sınırtaş M, Sığırlı D, Akalın D. İshalli Olgularda *Clostridium difficile* Toksin Pozitifliğinin Retrospektif Analizi. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi* 2012; 42: 10-5.
164. Tunccan OG, Ulutan F, Karakus R. [The frequency of *Clostridium difficile* toxin in neutropenic and non-neutropenic patients with antibiotic-associated diarrhea and analysis of the risk factors]. *Mikrobiyoloji Bulteni* 2008; 42(4): 573-83.

165. Turan M LB, Kayali R, Guldemir D, Esen B. Evaluation of patients with *Clostridium difficile* associated diarrhea., Maribor: Slovenia. 2nd International C Difficile Symposium 2007; 52.
166. Jamal W, Pauline EM, Rotimi VO. Comparative performance of the GeneXpert *C. difficile* PCR assay and *C. diff* Quik Chek Complete kit assay for detection of *Clostridium difficile* antigen and toxins in symptomatic community-onset infections. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 2014; 29: 244-8.
167. Hirvonen JJ, Kaukoranta SS. Comparison of BD Max Cdiff and GenomEra *C. difficile* molecular assays for detection of toxigenic *Clostridium difficile* from stools in conventional sample containers and in FecalSwabs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2015; 34(5): 1005-9.
168. Goret J, Blanchi J, Eckert C, Lacombe S, Petit A, Barbut F, et al. Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathogens* 2015; 7: 33.
169. Van Broeck Johan NME, Soumillion Kate and Delmée Michel. Evaluation of *Clostridium Difficile* Detection in Stools Using Vidas® Gdh, Vidas® Cd A/B Or C. Dif Quik Chek Complete® in combination with Cepheid® GeneXpert®. 25rd ECCMID, Copenhagen 2015, Poster 0777 2015.
170. Vasoo S, Stevens J, Portillo L, Barza R, Schejbal D, Wu MM, et al. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection=Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 2014; 47(1): 75-8.
171. Kim H, Kim WH, Kim M, Jeong SH, Lee K. Evaluation of a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase and toxin for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Annals of Laboratory Medicine* 2014; 34(3): 235-9.

172. Samra Z, Madar-Shapiro L, Aziz M, Bishara J. Evaluation of a new immunochromatography test for rapid and simultaneous detection of *Clostridium difficile* antigen and toxins. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ* 2013; 15(7): 373-6.
173. Korman TM. Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2015; 36(1): 31-43.
174. Longtin Y, Trottier S, Brochu G, Paquet-Bolduc B, Garenc C, Loungnarath V, et al. Impact of the type of diagnostic assay on *Clostridium difficile* infection and complication rates in a mandatory reporting program. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013; 56(1): 67-73.
175. Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrin J, Ikpeama I, et al. Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(2): 373-8.
176. Cohen SH, Tang YJ, Silva J, Jr. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181(2): 659-63.
177. Rupnik M, Braun V, Soehn F, Janc M, Hofstetter M, Laufenberg-Feldmann R, et al. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters* 1997; 148(2): 197-202.
178. Scardina T, Labuszewski L, Pacheco SM, Adams W, Schreckenberger P, Johnson S. *Clostridium difficile* infection (CDI) severity and outcome among patients infected with the NAP1/BI/027 strain in a non-epidemic setting. *Infection Control and Hospital Epidemiology: the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2015; 36(3): 280-6.
179. Putsathit P, Morgan J, Bradford D, Engelhardt N, Riley TV. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens. *Pathology* 2015; 47(2): 165-8.

180. Chiang D, Ng S, La MV, Jureen R, Lin RT, Teo JW. Performance assessment of the BD MAX Cdiff assay in comparison to Xpert C. difficile assay in a setting with very low prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Anaerobe* 2014; 30: 156-8.
181. Dalpke AH, Hofko M, Zorn M, Zimmermann S. Evaluation of the fully automated BD MAX Cdiff and Xpert C. difficile assays for direct detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(6): 1906-8.
182. Leitner E, Einetter M, Grisold AJ, Marth E, Feierl G. Evaluation of the BD MAX Cdiff assay for the detection of the toxin B gene of *Clostridium difficile* out of faecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 76(3): 390-1.
183. Shin BM, Yoo SM, Shin WC. Evaluation of Xpert C. difficile, BD MAX Cdiff, IMDx C. difficile for Abbott m2000, and Illumigene C. difficile Assays for Direct Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Specimens. *Annals of Laboratory Medicine* 2016; 36(2): 131-7.
184. Yoo J, Lee H, Park KG, Lee GD, Park YG, Park YJ. Evaluation of 3 automated real-time PCR (Xpert C. difficile assay, BD MAX Cdiff, and IMDx C. difficile for Abbott m2000 assay) for detecting *Clostridium difficile* toxin gene compared to toxigenic culture in stool specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015; 83(1): 7-10.
185. Abrahao C, Carman RJ, Hahn H, Liesenfeld O. Similar frequency of detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxins in patients with antibiotic-associated diarrhea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2001; 20(9): 676-7.
186. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(8): 2785-91.

187. Forward LJ, Tompkins DS, Brett MM. Detection of *Clostridium difficile* cytotoxin and *Clostridium perfringens* enterotoxin in cases of diarrhoea in the community. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52(Pt 9): 753-7.
188. Joshy L, Chaudhry R, Dhawan B, Kumar L, Das BK. Incidence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from antibiotic-associated diarrhoeal patients: a prospective study in an Indian hospital. *The Journal of Hospital Infection* 2006; 63(3): 323-9.
189. Heimesaat MM, Granzow K, Leidinger H, Liesenfeld O. Prevalence of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium perfringens* enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhea. *Infection* 2005; 33(5-6): 340-4.
190. Vaishnavi C, Kaur S. *Clostridium perfringens* enterotoxin in antibiotic-associated diarrhea. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 2008; 51(2): 198-9.
191. Borriello SP, Barclay FE, Welch AR, Stringer MF, Watson GN, Williams RK, et al. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *Journal of Medical Microbiology* 1985; 20(3): 363-72.
192. Bartholomew BA, Stringer MF, Watson GN, Gilbert RJ. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Journal of Clinical Pathology* 1985; 38(2): 222-8.